



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

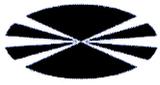
Facultad de Ciencias

**ENSAYO DE UN EXTRACTO DE
EUCALIPTO COMO FUNGICIDA
FRENTE A *PHYTOPHTHORA CAPSICI***

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Jessica Pardo Barrela

Curso 2012/2013



TRABALLO FIN DE GRAO

D. José Díaz Varela e D. Javier Veloso Freire autorizan a presentación do Traballo de Fin de Grao “Ensayo de un extracto de eucalipto como fungicida frente a *Phytophthora capsici*” presentado por Jessica Pardo Barrela para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña, a 18 de xullo de 2013

Asdo.: José Díaz Varela

Asdo.: Javier Veloso Freire

Índice

	Pág.
1. Introducción	1
2. Objetivos	8
3. Material y métodos	8
3.1 Material vegetal	8
3.2 Material fúngico	8
3.3 Preparación del extracto	9
3.4 Ensayo fungicida en placa	9
3.5 Ensayo fungicida en planta	10
3.6 Análisis estadístico	12
4. Resultados y discusión	12
4.1 Ensayo fungicida en placa	12
4.2 Ensayo fungicida en planta	14
5. Conclusiones	17
6. Bibliografía	17

1. Introducción

Phytophthora capsici Leon. es un patógeno de plantas cultivadas, descrito por primera vez en 1922 por Leon H. Leonian en plantaciones de pimiento en Nuevo México (Leonian, 1922). Antiguamente se incluía en el reino “hongos”, pero estudios recientes han permitido una división más adecuada, en la que ese reino “hongos” desaparece para dar lugar a tres Reinos distintos: Chromista, Protozoa y Fungi. En uno de esos tres Reinos, el de los Cromistas, se incluye a *Phytophthora capsici*. Dentro del Reino Chromista, este patógeno se encuentra en el Filo Oomycota, Clase Oomycetes, Orden Pythiales, Familia Pythiaceae, Género Phytophthora (del griego phyton, “planta” y pthora, “destructor”) y Especie *P. capsici* (García-Jiménez *et al.*, 2010; Lamour *et al.*, 2012).

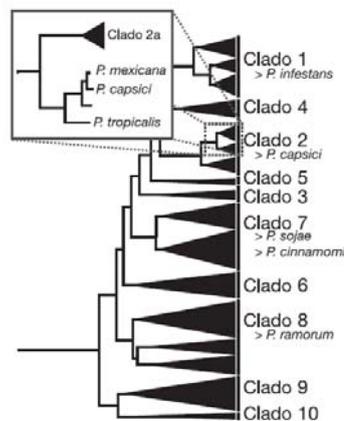


Figura 1. Filogenia de *Phytophthora* basada en 7 loci nucleares en la que se observa la división en 10 clados. *Phytophthora capsici* se incluye en el clado 2. Imagen tomada de Lamour *et al.* (2012).

Otros estudios en los que se emplearon siete de los loci más representativos de este género (compuestos por alrededor de 8700 nucleótidos), consideran que es interesante dividir a las especies de *Phytophthora* en 10 grandes clados, de los cuales *P. capsici* se encontraría en el clado 2 (Fig. 1) (Blair *et al.* 2008).

Esta especie es causante de la podredumbre radical y de cuello, y de la marchitez foliar, floral y del fruto en un gran número de especies vegetales, por lo que podría decirse que tiene un amplio rango de huéspedes. Esto significa que ataca a especies pertenecientes a familias muy diversas (Tabla 1) (Erwin & Ribeiro, 1996).

El tipo de síntoma así como su severidad dependen del tipo de planta huésped, de la parte de la planta infectada y de las condiciones ambientales (Fig. 2). Por ejemplo, la infección en las raíces causa marchitez en las plántulas, mientras que en plantas adultas se observa enanismo, marchitez y, finalmente, la muerte (Hausbeck *et al.*, 2004; Lamour *et al.*, 2012).

La temperatura mínima para su crecimiento es de 10°C, la óptima 28°C y la máxima 35°C. En condiciones óptimas, (25-30°C y humedad alta) el tiempo entre la infección y la esporulación es de 2-3 días (Lamour *et al.*, 2012).

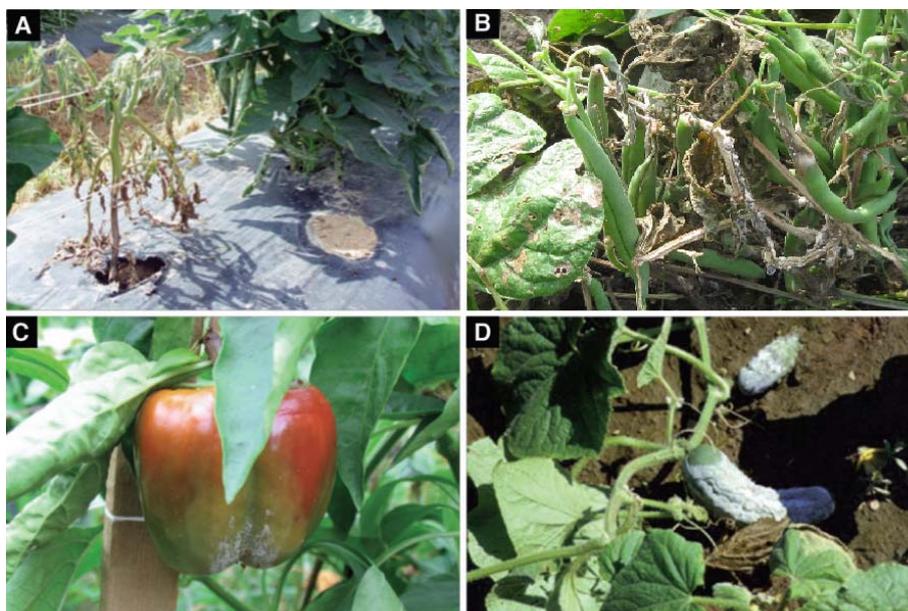


Figura 2. Síntomas causados por *P. capsici* en diversos huéspedes. (A) Planta de tomate con podredumbre radical y de cuello. (B) Planta de judía afectada por *P. capsici*. (C) Fruto de pimiento en cuya superficie se observan esporas. (D) Pepino con esporangios en la superficie. Imágenes tomadas de Lamour *et al.*, 2012 (A, C, D) y Cornell University <http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html> (B).

Tabla 1. Principales familias huésped de *P. capsici* indicando alguna de sus especies representativas. La ^a indica que el huésped fue inoculado artificialmente (Erwin & Ribeiro, 1996).

Familias	Especies	
	Nombre científico	Nombre común
Amaranthaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste y Reyn. ^a	Espinaca
Amarillidaceae	<i>Allium cepa</i> L.	Cebolla
Apiaceae	<i>Daucus carota</i> L. ^a	Zanahoria
Brassicaceae	<i>Brassica oleracea</i> L. ^a	Col
Cucurbitaceae	<i>Citrullus lanatus</i> Thunb.	Sandía
	<i>Cucumis sativus</i> L.	Pepino
	<i>Cucurbita máxima</i> Dcne.	Calabaza
Ebenaceae	<i>Diospyros kaki</i> L. ^a	Caqui
Fabaceae	<i>Phaseolus</i> sp.	Judía
	<i>Pisum sativum</i> L.	Guisante
Malvaceae	<i>Gossypium hirsutum</i> L. ^a	Algodón
	<i>Theobroma cacao</i> L.	Árbol del cacao
Orchidaceae	<i>Vanilla planifolia</i> Andr.	Vainilla
Rosaceae	<i>Malus pumila</i> Mill. ^a	Manzano
	<i>Prunus persica</i> L.	Melocotonero
Solanaceae	<i>Capsicum annuum</i> L.	Pimiento
	<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.	Tomate
	<i>Solanum melongena</i> L.	Berenjena
Xanthorrhoeaceae	<i>Aloe</i> sp.	Aloe

La reproducción de *P. capsici* puede ser tanto sexual como asexual. La reproducción sexual necesita de la presencia de aislados de dos tipos de compatibilidad denominados A1 y A2, por lo que esta especie es heterotálica. Cuando los micelios de los tipos A1 y A2 entran en contacto, se inicia la producción de gametangios masculinos (llamados anteridios) y femeninos (llamados oogonios). Los anteridios y oogonios se fusionan entre sí para formar oosporas (diploides) (Fig. 3A) de gruesas paredes, capaces de mantenerse viables en el suelo durante años resistiendo condiciones ambientales desfavorables (Fig. 4)(Bowers *et al.*, 1990; Hausbeck & Lamour, 2004; Jiménez Díaz & Zabalgoceazcoa, 2010). Esas oosporas necesitan un período de dormición, que suele ser superior a ocho semanas, para poder germinar (Fig. 3B) y producir micelios sexualmente viables. La germinación de las oosporas puede ser estimulada mediante diversos métodos, como tratamientos químicos o daño mecánico (Erwin & Ribeiro, 1996). Durante la germinación, las oosporas producen tubos germinales que se ramifican para dar lugar al micelio típico y/o producen esporangios y largos pedicelos (Fig. 4) (Lamour *et al.*, 2012).

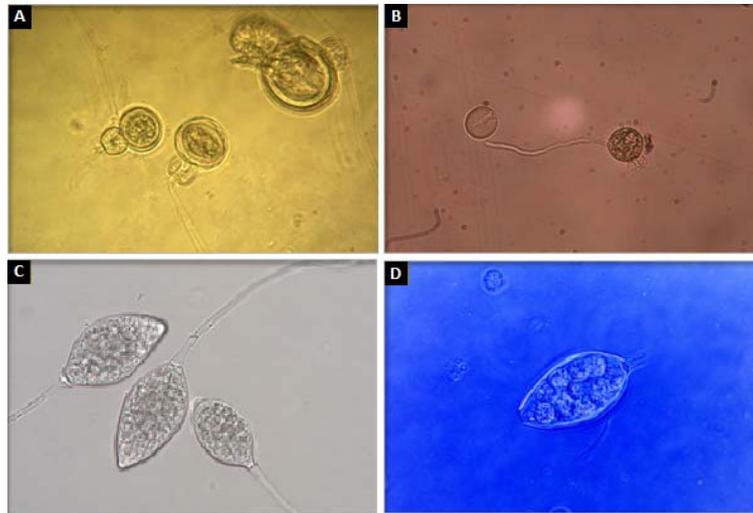


Figura 3. Elementos implicados en la reproducción de *P. capsici* (A) Oospora. (B) Oospora comenzando a germinar. (C) Esporangios. (D) Esporangio con zoosporas en su interior a punto de ser liberadas. Tomado de: Cornell University. Phytophthora blight (*P. capsici*). <http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html> (15/07/13).

Resulta interesante el hallazgo de oosporas de *P. capsici* en el tracto digestivo de algunas larvas de mosca de la familia Sciaridae. Aunque no se ha demostrado su viabilidad en este caso concreto, ésta si ha sido demostrada en el caso de especies de oomicetos íntimamente relacionadas con *P. capsici*, concretamente en *Pythium* spp. Esto podría indicar que, en algunos casos, las oosporas se dispersan gracias a vectores (Gardiner *et al.*, 1990).

Por otro lado, la reproducción asexual se da bajo condiciones ambientales favorables. Esta implica la producción de zoosporas biflageladas que se forman en el interior del esporangio y que son liberadas al medio, donde, si hay agua disponible, se desplazan mediante quimiotaxis y siguiendo un geotropismo negativo (Fig. 3C y Fig. 3D)(Lamour *et al.*, 2012). Esa quimiotaxis parece ser una respuesta inespecífica a ciertos aminoácidos (como pueden ser los ácidos aspártico y glutámico, la arginina y la metionina) y al etanol, secretado por las raíces de

la planta en condiciones de anaerobiosis asociadas a la saturación de agua en el suelo. No obstante, la quimiotaxis de las zoosporas en la inmediata proximidad de la superficie radical, es mediada en parte por campos eléctricos generados por las raíces como consecuencia del transporte iónico en superficie. Una vez la zoospora alcanza la raíz de la planta se produce un enquistamiento y una adhesión a la superficie vegetal. La adhesión en el Género *Phytophthora* implica la liberación de compuestos almacenados en vesículas citoplasmáticas, constituidos principalmente por glicoproteínas de alto peso molecular (Jiménez Díaz & Zabalgoeazcoa, 2010). En algunos casos pueden observarse apresorios en la zona de infección. La penetración a través de la superficie de las hojas se puede producir a través de aberturas naturales como los estomas (Katsura *et al.*, 1960). La infección también puede comenzar cuando una hifa penetra a través de la cutícula y accede a las células huésped (Fig. 5) (Lamour *et al.*, 2012).



Figura 4. Ciclo de infección de *P. capsici*. Las letras en rojo se refieren a la fase sexual y las de color azul a la fase asexual. Tomado y traducido de: Cornell University. *Phytophthora blight (P. capsici)*. <http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html> (15/07/13).

P. capsici se considera un organismo hemibiotrofo, ya que a lo largo de la infección pasa por dos etapas distintas (Fig. 5). La primera de ellas se caracteriza por una aparente normalidad en la planta, en la que no se observan síntomas. En esta etapa el oomiceto actuaría como un biotrofo. En la siguiente etapa, las células de la planta infectada comienzan a morir y se empiezan a observar síntomas. En esta segunda fase, *P. capsici* actuaría como un necrotrofo (Lamour *et al.*, 2012). Esto supone un gran problema para los agricultores, ya que en el momento de la cosecha los frutos pueden parecer en perfectas condiciones y sin síntomas visibles. Sin embargo, durante el almacenamiento o cuando los frutos llegan al mercado, los síntomas aparecen repentinamente. Esto se debe a que en el momento de la cosecha, el oomiceto se encontraba en la etapa de biotrofo y, durante el almacenamiento, se inició la etapa de necrotrofo (Hausbeck *et al.*, 2004).

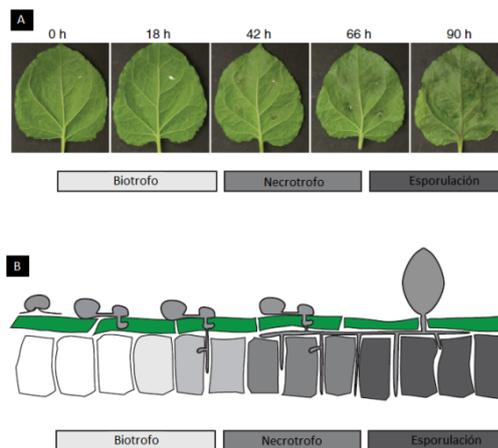


Figura 5. (A) Efectos de la infección de *P. capsici* en hojas de *Nicotiana benthamiana* Domin en sus distintas fases. (B) Esquema de las fases de la infección por *P. capsici* (Lamour *et al.*, 2012).

Una vez que se ha establecido en una región, este patógeno es muy difícil de controlar. La mayoría de las estrategias se centran en reducir las pérdidas económicas limitando el suministro de agua. Esto puede hacerse mediante diversos métodos como: suelos bien drenados, riego por goteo, crecimiento en espalderas, etc. (Lamour *et al.*, 2012). Durante años, los agricultores han usado un reducido número de fungicidas para combatir los síntomas causados por oomicetos. Estos fungicidas pertenecen a distintas clases (Tabla 2), entre las que destacan las fenilamidas, comúnmente denominadas PAFs (Schwinn & Staub, 1995). Dentro de las fenilamidas, el metalaxil (Fig. 6A) y el mfenoxam son los más importantes. Por un lado, el metalaxil fue introducido en 1977 y permitió un control eficaz de *Phytophthora*; sin embargo, su uso intensivo condujo a la aparición nuevos genotipos resistentes (Davidse *et al.*, 1991). Por ello, la mayor parte fue retirado del mercado hasta que se consiguieron desarrollar productos que combinaban el metalaxil con otros fungicidas haciéndolo más eficaz (Fig. 6B). El metalaxil inhibe específicamente la incorporación de uridina al RNA en oomicetes sensibles. Además, aunque en menor medida, también afecta a la incorporación de timidina al DNA y fenilamina a las proteínas. Por su parte, el mfenoxam es el enantiómero activo contenido en el metalaxil (Russell, 1995; Parra & Ristaino, 1998, 2001).

El problema de estos fungicidas sintéticos es la acumulación de residuos tóxicos en el suelo, la contaminación ambiental y la alteración del equilibrio biológico del suelo, al afectar a microorganismos no diana que podrían ser beneficiosos. A estos problemas se le suma, como ya se mencionó anteriormente, la aparición de cepas resistentes (Bharathi *et al.*, 2004).

Tabla 2. Principales clases de fungicidas que se han utilizado frente a oomicetos y algunos de sus representantes más importantes (Schwinn & Staub, 1995).

Clases de fungicidas	Representantes de cada clase
Carbamatos	Propamocarb
Isoxazoles	Himexazol
Oximas cianoacetamidas	Cimoxanil
Fosfatos de etilo	Fosetil
Fenilamidas	Furalaxil, metalaxil, benalaxil y mefenoxam
2,6 Dinitroanilinas	Dimetomorf y fluazinam
Morfolinas	Metoxiacrilatos

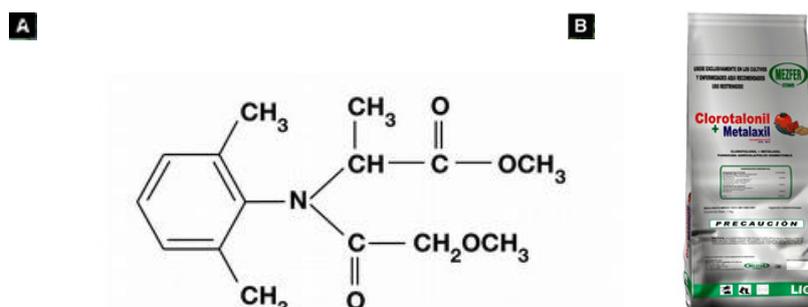


Figura 6. (A) Estructura química del metalaxil. (B) Fungicida de la casa MEZFER crown formado por la combinación de dos fungicidas: el metalaxil y el clorotalonil, y que se comercializa en la actualidad (<http://www.mezfer.net>, 9/7/2013).

Como alternativa al uso de fungicidas sintéticos, diversos investigadores están buscando sustancias naturales procedentes de las plantas, que puedan resultar efectivas en el tratamiento frente a hongos patógenos. En muchos casos, esas sustancias le sirven a las plantas como mecanismo de defensa frente a microorganismos y herbívoros.

Los extractos de eucalipto (familia Myrtaceae) parecen una buena opción, ya que las diversas especies de esta planta son ampliamente conocidas por producir sustancias con actividad biocida frente a hongos, bacterias, insectos e incluso oomicetos. (Pattnaik *et al.*, 1996; Ramezani *et al.*, 2002; Delaquis *et al.*, 2002; Schelz *et al.*, 2006; Batish *et al.*, 2008). Además, los extractos de plantas también pueden ser utilizados para el tratamiento frente a patógenos que afectan a humanos, lo cual hace más interesante los estudios en este campo. De hecho, existen evidencias de los homínidos neandertales que vivían hace 60.000 años ya usaban plantas con fines curativos (Thomson, 1978; Stockwell, 1988; Elaissi *et al.*, 2012).

Las sustancias que contienen los extractos de eucalipto, y que les confieren esas propiedades antifúngicas, son metabolitos secundarios como los fenoles y los terpenoides, estos últimos, responsables del olor característico del follaje de este género (Foley & Lassak, 2004). Además, también son muy comunes los óxidos, éteres, alcoholes, aldehídos y cetonas (Brooker & Kleinig, 2006). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la composición del extracto va a variar en función de la especie de eucalipto que se use, de la parte de la planta de la que se haya obtenido, así como del clima, localización, tipo de suelo, edad de las hojas (o del material utilizado) y método empleado para la extracción (Conde *et al.*, 1996; Brooker & Kleinig, 2006). Algunos de los compuestos más importantes encontrados hasta el momento en distintas especies de eucalipto son: el 1,8-cineol, citronelal, citronelol, acetato de citronelilo, p-cimeno, limoneno, eucamalol, linalol, α -pineno, γ -terpineno, α -terpineol, alloocimeno y aromadendreno (Watanabe *et al.*, 1993; Li & Potts, 1995, 1996; Cimanga *et al.*, 2002; Batish *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008).

Otra ventaja que presentan los productos obtenidos de vegetales en el control de patógenos, es que pueden usarse en combinación con métodos de control biológico (usando microorganismos) para aumentar su eficacia (Duffy *et al.*, 1996; Muthukumar *et al.*, 2010). Esto se ha probado, por ejemplo, frente a *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp., un oomicete causante de la marchitez de plántula del pimiento (*Capsicum annuum*). En este caso se usaron extractos de hoja de un híbrido de *Allium sativum* L. x *Allium cepa* L. (Zimmu) combinados con *Trichoderma viride* Pers. Y *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula. Esta combinación reduce el desarrollo de la enfermedad aumentando el crecimiento de la planta. Así, en experimentos en placa usando solo una suspensión de esporas de *Trichoderma viride*, se observa una inhibición del crecimiento del micelio (respecto al control) de un 68%, usando una suspensión de esporas de *Pseudomonas fluorescens* un 71%, usando solo extracto de hoja de Zimmu al 10% un 84,8%, y usando una combinación de los tres un 86% de inhibición (Muthukumar *et al.*, 2010).

Por otro lado, estudios recientes han demostrado que los extractos de eucalipto muestran una fuerte actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., *Botryosphaeria dothidea* Moug. y *Diaporthe actinidiae* Sommer et Beraha en tratamientos postcosecha. La mayor o menor capacidad fungicida depende de la especie de eucalipto de la que se obtenga el extracto, así como del patógeno que se quiera combatir. Concretamente, de extractos de *Eucalyptus dalrympleana* Maiden se ha aislado un compuesto fenólico, el ácido gálico, que es capaz de inhibir en un 85% el crecimiento aéreo del micelio de *Botrytis cinerea* a una concentración de 5000mg/l (Oh *et al.*, 2008). Además, el ácido gálico también inhibe totalmente la germinación de las esporas de esta especie a esas concentraciones. Otro compuesto fenólico de *Eucalyptus dalrympleana*, el ácido 3,4-dihidroxibenzoico, también es capaz de inhibir totalmente la germinación de esporas de *Diaporthe actinidiae* a una concentración de 5000 mg/l (Oh *et al.*, 2008).

Otro estudio, en el que se emplearon hojas maduras de 26 especies distintas de eucalipto frente a diversas bacterias Gram-negativas y Gram-positivas y de hongos, muestra que especies como *Eucalyptus globulus* Labill., *Eucalyptus maculata* Hook. y *Eucalyptus viminalis* Labill. inhiben fuertemente el crecimiento de Gram-positivas y de hongos (*Trichophyton mentagrophytes* (C.P. Robin) Sabour), sin embargo, no son efectivas inhibiendo

el crecimiento de Gram-negativas. Por otro lado, *Eucalyptus botryoides* Sm. y *Eucalyptus nitens* H. Deane & Maiden inhiben tanto el crecimiento de Gram-negativas como de Gram-positivas. El hecho de que haya diferencias en la capacidad de inhibición de Gram-positivas y Gram-negativas de las distintas especies de eucalipto se podría deber a las diferencias estructurales de su pared celular (la pared las primeras tiene una capa con gran contenido en lipopolisacáridos, y la de las segundas no). Esta diferencia hace que unos compuestos puedan atravesar la pared y afectar a las bacterias y otros no (Takahashi *et al.*, 2004).

Vista la gran variedad de utilidades, tanto en agricultura como en medicina, y la efectividad e inocuidad que parecen tener las sustancias procedentes de los integrantes del género *Eucalyptus*, que cuenta con alrededor de 700 representantes (Batish *et al.*, 2008), resultan interesantes estudios que profundicen más en este campo. Estos estudios van desde la identificación de los componentes de cada una de las partes de esta planta que pueden resultar útiles para el tratamiento de microorganismos patógenos, hasta experimentos *in vivo* para demostrar su eficacia en distintos organismos huésped afectados por diferentes patógenos. Los experimentos descritos a continuación suponen un primer paso para estudios de este tipo.

2. Objetivos

El principal fin de este trabajo es determinar si los extractos obtenidos a partir de hojas de *Eucalyptus globulus* tienen capacidad fungicida frente al patógeno *P. capsici*, tanto en placa como en cultivo vegetal, en este caso, de *Phaseolus vulgaris* L.

3. Material y métodos

3.1 Material vegetal

Para este experimento se han usado hojas jóvenes de *E. globulus* recogidas en el Monte de La Zapateira (La Coruña, España) en marzo de 2013. Estas hojas se han mantenido congeladas a -20°C desde el momento de su recolección hasta la preparación de los extractos.

Además, se han empleado plántulas de *Phaseolus vulgaris*. Para la obtención de las mismas, se sembraron semillas de esta especie en perlita, se regaron con solución nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950), y se mantuvieron durante una semana en una cámara con condiciones de temperatura y luz controladas (temperatura constante de 25°C y fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad). Después de esa semana, las plántulas germinadas se trasplantaron a recipientes individuales con una proporción de tierra-perlita 3:1 (V/V). Todos los días se comprobó que dichas plántulas tuvieran la suficiente humedad en el sustrato. De no ser así, se regaron con agua. Once días tras la siembra se utilizaron en el experimento.

3.2 Material fúngico

Para determinar la capacidad fungicida del extracto de *E. globulus* se empleó una cepa muy virulenta de *P. capsici*: la PC450 proporcionada por Franck Panabières (UMR INRA, Francia). Esta cepa se mantuvo durante todo el trabajo en placas con medio PDA ("Agar

Dextrosa Patata”) realizando resiembras semanalmente a medios frescos. Los cultivos de *P. capsici* se mantuvieron a temperatura ambiente.

3.3 Preparación del extracto

Para la preparación del extracto se machacó con un mortero 1 g de hojas de *E. globulus* en 5 ml de etanol 80%. Para facilitar el machacado, se eliminó previamente la nerviación de las hojas.

Posteriormente, se pasó la mezcla obtenida por un filtro de lana de vidrio para limpiar el extracto y se enrasó con etanol 80 % hasta 5 ml. Finalmente el extracto obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización en los ensayos.

3.4 Ensayo fungicida en placa

La preparación de las placas con extracto se hizo según lo especificado en la tabla. 3. Es importante añadir el extracto después de que haya finalizado el proceso de esterilización del medio PDA en el autoclave para evitar que sustancias presentes en dicho extracto sean dañadas por las altas temperaturas.

Tabla 3. Composición de los medios utilizados en el ensayo fungicida en placa.

Nombre del medio	Composición
Medio control	1 ml etanol 80% + 100 ml medio PDA
Medio 1	0,25 ml de extracto + 0,75 ml de etanol 80% + 100 ml medio PDA
Medio 2	0,5 ml de extracto + 0,5 ml de etanol 80 % + 100 ml medio PDA
Medio 3	1 ml de extracto + 100 ml de medio PDA

Con ayuda de un sacabocados estéril de 11 mm de diámetro, se perforó el cultivo de *P. capsici* PC450 en medio PDA, para conseguir fragmentos circulares (a los que a partir de ahora nos referiremos como inóculo). Se colocó un inóculo en el centro de cada una de las placas del ensayo, se sellaron las placas con parafilm y se incubaron a 20°C. Se utilizaron cuatro placas por cada tipo de medio y por cada experimento. El experimento se repitió dos veces.

A las 24, 48, 72 y 96 horas, se midió el crecimiento del oomiceto con la ayuda de un calibre digital. Por cada placa se tomaron dos medidas según lo especificado en la Fig. 7 y se hizo una media entre esas medidas.



Figura 7. Cultivo de *P. capsici* de una semana en placa con medio PDA. Las líneas en rojo que indican el modo correcto de tomar las medidas de diámetro.

3.5 Ensayo fungicida en planta

Los experimentos se realizaron dos veces. En cada uno de ellos, se pulverizaron diez plántulas de *P. vulgaris* de once días. Cinco de ellas se pulverizaron con una mezcla de 100 ml de agua destilada y 1 ml de etanol 80% (serán las plántulas control), y las otras cinco con una mezcla de 100 ml de agua destilada y 1 ml de extracto. Para pulverizar se colocó una pantalla entre las dos hojas de la plántula (Fig. 8) evitando que una de ellas fuera pulverizada.

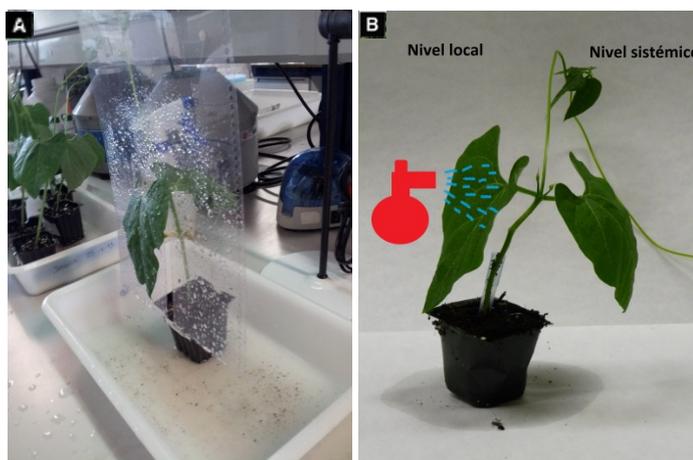


Figura 8. (A) Imagen explicativa del modo correcto de colocar la pantalla. (B) Esquema indicando el nivel local y el nivel sistémico respecto a la hoja pulverizada.

Cada plántula fue pulverizada hasta que el líquido cubrió toda la hoja y comenzó a gotear. Es importante indicar de algún modo que hoja ha sido la pulverizada, esto se hizo poniendo una etiqueta en la zona de la maceta donde se encuentra esa hoja. Después de la pulverización se introdujeron las plántulas en la cámara de nuevo (temperatura constante de 25°C y fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad).

Un día después se procedió a la inoculación del hongo. Para ello se usaron los cultivos de *P. capsici* PC450 a los que, del mismo modo que en el ensayo en placa, se les hicieron incisiones con un sacabocados estéril de 11 mm de diámetro. En cada una de las hojas de cada plántula se colocaron dos inóculos (Fig. 9) humedecidos en agua destilada para facilitar su adherencia.



Figura 9. Imagen explicativa de como colocar los inóculos.

Luego, las plántulas control con su bandeja, se introdujeron en una caja de plástico con agua en el fondo (1 cm de profundidad) y una hoja de papel de filtro que sobresalía a la superficie; de este modo había una elevada evaporación y se creaba un ambiente muy húmedo (propicio para la infección por *P. capsici*) en el interior de la caja cerrada. Se hizo lo mismo con las plántulas del tratamiento con extracto y se introdujeron ambas cajas en una cámara con las condiciones ya mencionadas de fotoperiodo y temperatura.

Se midió el crecimiento de la lesión alrededor de los inóculos a las 48 y 72 horas, teniendo en cuenta las medidas a nivel sistémico y local por separado. Las medidas se hicieron, al igual que en el caso del ensayo en placas, con un calibre digital y tomando dos medidas por cada inóculo.

Por otro lado, también se cuantificó la infección a las 24, 48 y 72 horas según la siguiente escala de severidad:

- 0: no se observa infección.
- 1: la infección ocupa entre el 0 y el 25% de la superficie total de la hoja.
- 2: la infección ocupa entre el 26 y el 50% de la superficie total de la hoja.
- 3: la infección ocupa entre el 51 y el 75% de la superficie total de la hoja.
- 4: la infección ocupa entre el 76 y el 100% de la superficie total de la hoja.

Además, a partir de los valores obtenidos usando la escala de severidad, se calculó el valor de AUDPC (Area under the disease progress curve o Área bajo la curva de progreso de la enfermedad), según la fórmula de la Fig. 10 (Campbell & Madden, 1990).

$$AUDPC = \sum_i^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Figura 10. Fórmula para el cálculo de AUDPC donde y_i = índice de severidad en la observación i , t_i = días tras la inoculación en el momento de la observación i y n = número de observaciones.

El valor de AUDPC combina, por tanto, los datos de severidad con el factor tiempo. Esto permite tener una idea más precisa del grado de protección que proporciona el tratamiento en función de la velocidad de aparición de los síntomas.

3.6 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos, tanto del ensayo fungicida en placa, como del ensayo fungicida en planta, se hizo empleando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV. En el ensayo del fungicida en placa se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para hacer una comparación entre varias muestras. Para el ensayo del fungicida en planta se empleó, siempre que fue posible, la prueba t-Student para hacer una comparación entre dos muestras. En el caso de que los datos no siguieran una distribución normal, se usó la prueba de Mann-Whitney. En todos los test se usó un nivel de confianza del 95%.

4. Resultados y discusión

4.1 Ensayo fungicida en placa

Al comparar las medias de los datos de diámetro de micelio de *P. capsici* del control, tratamientos de 0,25 ml, 0,5 ml y 1 ml de extracto a 24, 48, 72 y 96 horas se llega a la conclusión de que no existieron diferencias entre los tratamientos a ninguno de los tiempos (test de Kruskal-Wallis, p-valor= 0,68245; 0,41222; 0,23419 y 0,14932, respectivamente) (Fig. 11). En la figura 11 se observa que, el tamaño de los diámetros de colonia aumentó con el paso de las horas en todos los tratamientos. Sin embargo, parece que con el paso del tiempo hubo un retraso del crecimiento del micelio en el medio 3, por lo que en futuros experimentos sería interesante aumentar el tiempo para ver si efectivamente hay una inhibición con respecto al control.

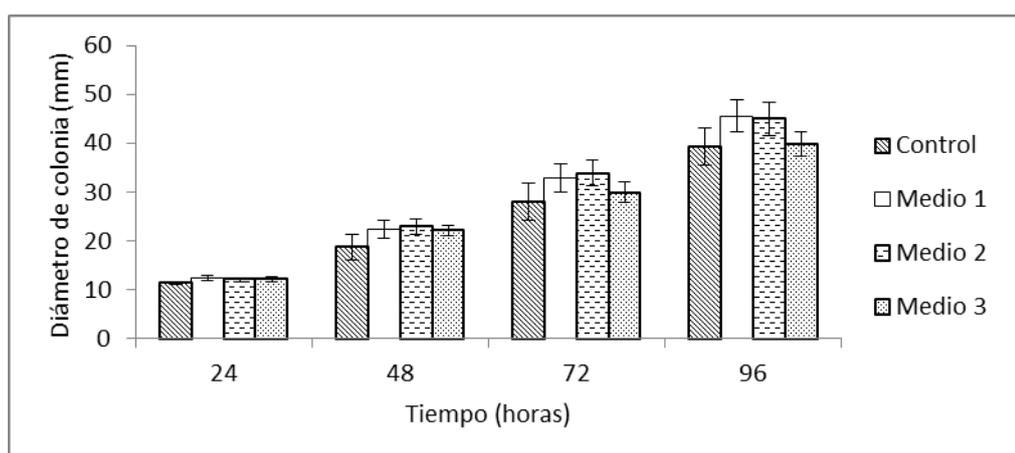


Figura 11. Media de los diámetros del micelio (mm) de *P. capsici* en placa pasadas 24, 48, 72 y 96 horas desde la inoculación en los distintos medios (medio 1= 0,25 ml de extracto, medio 2= 0,5 ml extracto y medio 3= 1 ml extracto). Los datos muestran las medias \pm su error estándar.

A pesar de los resultados de este ensayo, en los que no parece haber diferencias entre los tratamientos, otros estudios similares en los que se comprobaron las actividades antifúngicas de compuestos de eucalipto frente a otros patógenos en placa muestran en algunos casos lo contrario. Al emplear aceites esenciales de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. frente a dos hongos patógenos de plantas, (*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk y *Fusarium oxysporum* Schletdl.) se observó inhibición del crecimiento a concentraciones de 5mg/ml (inhibición del 100% y 84% respectivamente). Sin embargo, en este mismo estudio, se observó que el crecimiento de otro patógeno, el hongo *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl., no se vio inhibido en absoluto por los aceites esenciales de esta especie de eucalipto ni a una concentración de 5 mg/ml ni a 10 mg/ml (Siramon *et al.*, 2013). Otro experimento en placa con aceites esenciales de *E. globulus* muestran que estos no afectaron al crecimiento de *Fusarium oxysporum* a ninguna de las concentraciones empleadas (Barrera-Necha *et al.*, 2009). Otro estudio en placa en el que se emplearon extractos de hoja de *E. globulus*, al 10% de concentración, frente a un oomicete (*Pythium aphanidermatum*) muestran un 68,6% de inhibición del crecimiento del micelio respecto al control (Muthukumar *et al.*, 2010). Finalmente, un estudio en el que se emplearon extractos de hoja de *Eugenia jambolana* Lam. (familia Myrtaceae, a la que también pertenece el eucalipto) al 20% de concentración, muestran un 100% de inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp *lupini*. También los extractos de frutos de esa especie fueron efectivos (Abdel-Monaim *et al.*, 2011). Es por eso que los resultados dependen mucho tanto de la especie con la que se hizo el extracto como del patógeno utilizado. Ante esta diversidad de resultados, para poder llegar a una conclusión razonable acerca de si los extractos de *E. globulus* tienen o no efecto fungicida frente a *P. capsici in vitro*, sería necesario hacer más repeticiones del experimento. Además de las repeticiones también sería conveniente probar concentraciones más altas del extracto y utilizar otro método para cuantificar el crecimiento de *P. capsici*. La necesidad de utilizar otro método se debe a que midiendo únicamente el diámetro de la colonia, no se tienen en cuenta su densidad. Este problema se intuye en la Figura 12, en la que se observa que, aunque los diámetros de colonia de la placa control y la que contienen 1 ml de extracto son casi iguales, si nos fijamos en la densidad del micelio, la colonia de la placa control es claramente más densa que el resto. Lo mismo ocurre si comparamos dos a dos la densidad de micelio del resto de placas. Para evitar este inconveniente, se podría hacer el cultivo en medio líquido en lugar de en medio sólido para así poder determinar el peso seco de la colonia en lugar del diámetro. El peso seco sería una medida más adecuada para estimar la biomasa del patógeno.

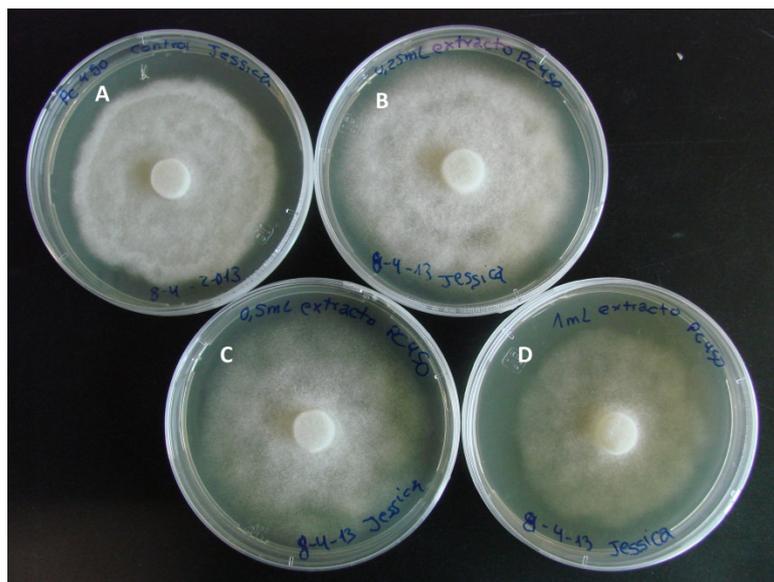


Figura 12. Cultivos en placa de *P.capsici* de 96 horas en los distintos medios utilizados para el ensayo. Se observan diferencias en la densidad de micelio entre las distintas placas: (A) Medio control, (B) medio 1, (C) medio 2 y (D) medio 3.

4.2 Ensayo fungicida en planta

Atendiendo a las figuras 13 y 14 parece que, a nivel local, se produjo un descenso del área enferma en las hojas que han sido tratadas con extracto de eucalipto, tanto a 48 como a 72 horas. Esa reducción del área infectada respecto al control parece mayor pasadas 72 horas. Por el contrario, a nivel sistémico la reducción del área enferma con respecto al control fue prácticamente imperceptible tanto a 48 como a 72 horas.

Al comparar el área enferma del control a nivel local, con la del tratamiento con extracto de eucalipto se concluyó que no existían diferencias significativas entre los tratamientos ni a 48 ni a 72 horas (t-Student, p-valor igual a 0,10212 y 0,06509, respectivamente) (Fig. 13 y 14). En el caso del 72 horas, si se disminuyera el nivel de confianza al 90%, si que habría diferencias significativas entre ambos tratamientos (Fig. 14).

Por otro lado, el área enferma del control a nivel sistémico con la del tratamiento con extracto de eucalipto se concluyó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ni a 48 ni a 72 horas (t-Student, p-valor igual a 0,67377 y 0,86329, respectivamente) (Fig. 13 y 14).

En cuanto a la los valores de AUDPC, se hizo una comparación entre los obtenidos a nivel local en la hoja control y la tratada con extracto de eucalipto llegándose a la conclusión de que no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos (t-Student, p-valor=0,43506). En el caso de los valores obtenidos a nivel sistémico en la hoja control y la tratada con extracto de eucalipto, la conclusión es la misma (test de Mann-Whitney, p-valor=0,30265) (Tabla 4).

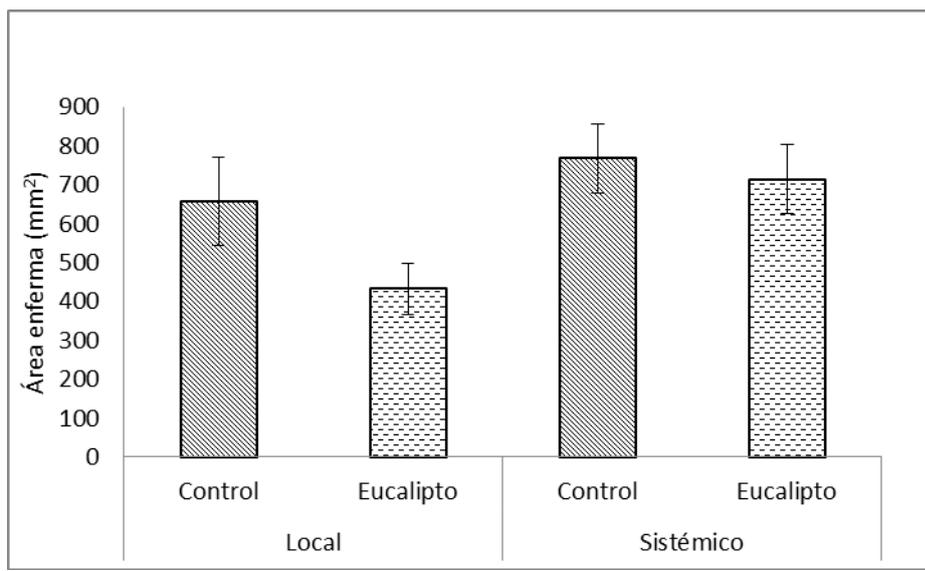


Figura 13. Área enferma (mm²) pasadas 48 horas desde la inoculación en las hojas de *P. vulgaris* tanto a nivel local como sistémico, tratadas con extracto de eucalipto o no (control). Los datos muestran las medias \pm su error estándar.

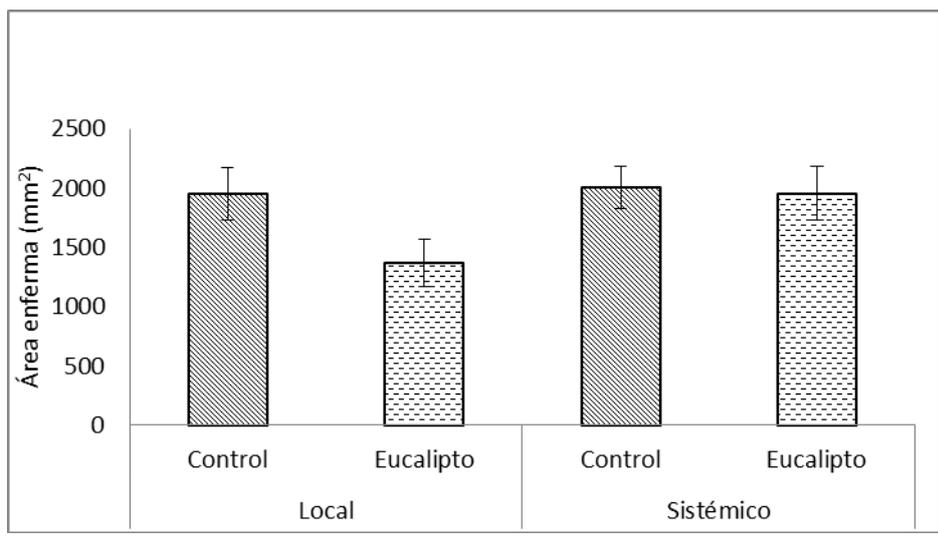


Figura 14. Área enferma (mm²) pasadas 72 horas desde la inoculación en las hojas de *P. vulgaris* tanto a nivel local como sistémico, tratadas con extracto de eucalipto o no (control). Los datos se corresponden con las medias \pm su error estándar.

Tabla 4. Valores medios de AUDPC con su error estándar en los distintos grupos tratados e inoculados con *P. capsici*.

	Local	Sistémico
Control	2,95 \pm 0,24	3,10 \pm 0,18
Eucalypto	2,70 \pm 0,20	2,85 \pm 0,08

A pesar de estos resultados, existen otros experimentos *in vivo* que utilizaron la especie *Lupinus termis* Forsik (representante de la familia Fabaceae, al igual que *P. vulgaris*). En ellos se analizó la capacidad fungicida de extractos de hojas de *Eugenia jambolana* (componente de la familia Myrtaceae, al igual que *E. globulus*) frente a *Fusarium oxysporum*. Tras el estudio se concluyó que la aplicación de dichos extractos a semillas hace que la supervivencia de las plantas pase de un 54,94% (control) a un 86,67% (extracto en éter) o 93,75% (extracto en butanol) (Abdel-Monaim *et al.*, 2011).

Muthukumar *et al.* (2010) encontraron algo semejante con extractos de hoja de un híbrido de *Allium sativum* x *Allium cepa* (Zimmu). Dichos extractos se aplicaron solos y combinados con suspensiones de esporas de *Trichoderma viride* y *Pseudomonas fluorescens* para controlar la marchitez de plántula causada por *Pythium aphanidermatum*. Así, las semillas de *Capsicum annum* (pimiento) tratadas mostraron una reducción en la incidencia de la enfermedad (tabla 5) (Muthukumar *et al.*, 2010). Cabe destacar que la combinación del extracto con la suspensiones de esporas tiene mayor efecto que el metalaxil, que como ya se ha mencionado, es un fungicida sintético.

Tabla 5. Eficacia del tratamiento de las semillas con extractos de hoja de Zimmu (híbrido de *Allium sativum* x *Allium cepa*) y agentes de biocontrol frente a la marchitez de la plántula de pimiento en invernadero (Muthukumar *et al.*, 2010).

Tratamiento	Reducción de la incidencia de la enfermedad respecto al control (%)	
	Antes de emerger	Después de emerger
Extracto Zimmu ⁽¹⁾	46,4	36,8
<i>T. viride</i> ⁽²⁾	49,2	37,3
<i>P. fluorescens</i> ⁽³⁾	50,9	40,2
Combinación de (1), (2) y (3)	77	65,3
Metalaxil	73,1	66,8

Aun cuando los resultados del experimento indican que estadísticamente, el tratamiento con extractos de *E. globulus* no reducen la infección de *P. vulgaris* por parte de *P. capsici*, es probable que haciendo más repeticiones del experimento y empleando concentraciones más elevadas del extracto, se obtuvieran unos resultados similares a los de los trabajos citados anteriormente, con los extractos obtenidos a partir de hojas de representantes de la familia Myrtaceae y de otras familias. Como ya hemos citado, dichos extractos son capaces de inhibir el crecimiento de hongos y oomicetos, en ocasiones, con una eficacia superior a la del metalaxil, un agente antifúngico sintético muy empleado para el control de patógenos de plantas tanto desde su introducción en el mercado hace 30 años, como en la actualidad (Davidse *et al.*, 1991; Schwinn & Staub, 1995; Bosmans, 2009).

5. Conclusiones

Tras la elaboración del presente trabajo, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- 1) El extracto alcohólico de eucalipto no muestra actividad fungicida a las concentraciones ensayadas.
- 2) Es necesario realizar más estudios para descartar o confirmar el potencial fungicida de los extractos de eucalipto.

6. Bibliografía

- Abdel-Monaim, M. F., Abo-Elyousr, K. A. M. & Morsy, K. M.** (2011) Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). Crop Prot. 30: 185-191.
- Barrera-Necha, L. L., Garduño-Pizaña, C. & García-Barrera, L. J.** (2009) *In vitro* antifungal activity of essential oils and their compounds and mycelial growth of *Fusarium oxysporium* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen. Plant Pathol. J. 8: 17-21.
- Batish, D.R., Singh, H.P., Setia, N., Kaur, S. & Kohli, R.K.** (2006). Chemical composition and phytotoxicity of volatile essential oils from intact and fallen leaves of *Eucalyptus citriodora*. Z. Naturforsch. 61: 465-471.
- Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K. & Kaur, S.** (2008) Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. Forest Ecol. Manage. 256: 2166-2174.
- Bharathi, R., Vivekananthan, R., Harish, S., Ramanathan, A. & Samiyappan, R.** (2004) Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. Crop Prot. 23: 835-843.
- Blair, J. E., Coffey, M. D., Park, S. Y., Geiser, D. M. & Kang, S.** (2008) A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. Fungal Genet. Biol. 45: 266-277.
- Bosmans, S.** (2009) On the evolution of pesticide resistance in *Phytophthora infestans* - an experimental evolution approach. Tesis Doctoral. Wageningen University, Países Bajos. ISBN 978-90-8585-309-1.
- Bowers, J. H., Papavizas, G. C. & Johnston, S. A.** (1990) Effect of soil temperature and soil-water matric potential on the survival of *Phytophthora capsici* in natural soil. Plant Dis. 74: 771-778.
- Brooker, M.I.H. & Kleinig, D.A.** (2006) Field Guide to Eucalypts. vol.1. South-eastern Australia, 3ªEd. Bloomings, Melbourne, Australia.
- Campbell, C. L. & Madden, L. V.** (1990) Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley and Sons, Nueva York, Estados Unidos.

- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totte´ , J., Pieters, L. & Vlietinck, A.J.** (2002) Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharm.* 79: 213-220.
- Conde, E., Cadahia, E., García Vallejo, M. C. & Diez, R.** (1996) Composición polifenólica de madera, corteza y hojas de *Eucaliptus camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*. *Invest. Agr.: Sist. Recur. For.* 5: 333-350.
- Cornell University.** Phytophthora blight (*P. capsici*) <http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html> (15/07/13).
- Davidse, L. C., van den Berg-Velthuis, G. C. M., Mantel, B. C., & Jaspers, A. B. K.** (1991) Phenylamides and Phytophthora. Pages 349-360 En: *Phytophthora*. Lucas, J. A., Shattock, R. C., Shaw, D. S. & Cooke, L. R. (eds.) pp. 349-360. *British Mycol. Soc., Cambridge, Reino Unido.*
- Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B. & Mazza, G.** (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 74: 101-289.
- Duffy, B.K., Simon, A. & Weller, D.M.** (1996) Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. *Phytopathology* 86: 188-194.
- Elaissi, A., Rouis, Z., Salem, N. A. B., Mabrouk, S., Salem, Y. B., Salah, K. B. H., Auoni, M., Farhat, F., Chemli, R., Harzallah-Skhiri, F. & Khouja, M. L.** (2012) Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. *BMC Complement. Altern. Med.* 12: 81.
- Erwin, D.C. & Ribeiro, O.K.** (1996) *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, Estados Unidos.
- Foley, W. & Lassak, E.** (2004) The potential of bioactive constituents of *Eucalyptus* foliage as non-wood products from plantations. RIRDC Publication No 04/154. RIRDC. Canberra, Australia. ISBN 1741510627.
- García-Jiménez, J., Monte, E. & Trapero, A.** (2010) Los hongos y Oomicetos fitopatógenos. En: *Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos*. Jiménez Díaz, R. M. & Seguí, E. M. (eds.) pp. 23-50. SEF-Phytoma, Valencia, España.
- Gardiner, R. B., Jarvis, W. R., & Shipp, J. L.** (1990) Ingestion of *Pythium* spp. by larvae of the fungus gnat *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Ann. Appl. Biol.* 116: 205-212.
- Hausbeck, M.K. & Lamour, K.H.** (2004) *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Dis.* 12: 1292-1303.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I.** (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347: 1-32.

- Jiménez Díaz, R. M. & Zabalgoeazcoa, I.** (2010) Infección y patogénesis en las micosis vegetales. En: Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. Jiménez Díaz, R. M. & Seguí, E. M. (eds.) pp. 51-85. SEF-Phytoma, Valencia, España.
- Katsura, K. & Miyazaki, S.** (1960) Leaf penetration by *Phytophthora capsici* Leonian. Sci. Rep. Kyoto Perfect. Univ. Agric. 12: 65-70.
- Lamour, K.H., Julietta Jupe, R.S. & Huitema, E.** (2012) The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. Mol. Plant Pathol. 13: 329-337.
- Leonian, L.H.** (1922) Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. Phytopathology 12: 401-408.
- Li, H., Madden, J.L. & Potts, B.M.** (1995) Variation in volatile leaf oils of the Tasmanian *Eucalyptus* species I. Subgenus Monocalyptus. Biochem. Syst. Ecol. 23: 299-318.
- Li, H., Madden, J.L. & Potts, B.M.** (1996) Variation in volatile leaf oils of the Tasmanian *Eucalyptus* species II. Subgenus Symphyomyrtus. Biochem. Syst. Ecol. 24: 547-569.
- Liu, X., Chen, Q., Wang, Z., Xie & L. & Xu, Z.** (2008) Allelopathic effects of essential oil from *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* on pathogenic fungi and pest insects. Front. Forestry China. 3: 232-236.
- Mezfer Crown** (2011) Líneas de productos <http://www.mezfer.net> (9/7/2013).
- Muthukumar, A., Eswaran A., Nakkeeran, S. & Sangeetha G.** (2010) Efficacy of plant extracts and biocontrol agents against *Pythium aphanidermatum* inciting chilli damping-off. Crop Prot. 29: 1483-1488.
- Oh, S.-O., Kim, J. A., Jeon, H.-S., Park, J. C., Koh, Y. J., Hur, H. & Hur, J.-S.** (2008) Antifungal activity of eucalyptus-derived phenolics against postharvest pathogens of kiwifruits. Plant Pathol. J. 24: 322-327.
- Parra, G., & Ristaino, J.** (1998) Insensitivity to ridomil gold (mefenoxam) found among field isolates of *Phytophthora capsici* causing Phytophthora blight on bell pepper in North Carolina and New Jersey. Plant Dis. 82: 711.
- Parra, G., & Ristaino, J. B.** (2001) Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing Phytophthora blight of bell pepper. Plant Dis. 85: 1069-1075.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V. R. & Kole, C.** (1996) Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils *in vitro*. Microbios 86: 237-246.
- Ramezani, H., Singh, H. P., Batish, D. R. & Kohli, R. K.** (2002) Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. Fitoterapia 73: 261-262.
- Russell, P. E.** (1995) Fungicide resistance: occurrence and management. J. Agric. Sci. 124: 317-323.

- Schelz, Z., Molnar, J. & Hohmann J.** (2006) Antimicrobial and antiplasmodial activities of essential oils. *Fitoterapia* 77: 279-285.
- Schwinn, F., & Staub, T.** (1995) Oomycete fungicides 16.1 Phenylamides and other fungicides against Oomycetes. En: *Modern selective fungicides, properties, applications, mechanisms of action*. Lyr, H. (ed.) pp. 323-346. Gustav Fischer Verlag, New York, Estados Unidos.
- Siramon, P., Ohtani, Y. & Ichiura, H.** (2013) Chemical composition and antifungal property of *Eucalyptus camaldulensis* leaf oils from Thailand. *Rec. Nat. Prod.* 7: 49-53.
- Stockwell, C.** (1988) *Nature's pharmacy*. Century Hutchinson Ltd., Londres, Reino Unido.
- Su, Y.C., Ho, C.L., Wang, I.C. & Chang, S.T.** (2006) Antifungal activities and chemical compositions of essential oils from leaves of four eucalypts. *Taiwan J. For. Sci.* 21: 49–61.
- Takahashi, T., Kokubo, R. & Sakaino, M.** (2004) Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 60-66.
- Thomson, W. A. R. (ed.)** (1978) *Medicines from the Earth*. McGraw-Hill Book Co., Maidenhead, Reino Unido.
- Watanabe, K., Shono, Y., Kakimizu, A., Okada, A., Matsuo, N., Satoh, A. & Nishimura, H.** (1993) New mosquito repellent from *Eucalyptus camaldulensis*. *J. Agric. Food Chem.* 41, 2164-2166.