

XII Congreso Ibérico de Agroingeniería

XII Congresso Ibérico de Agroengenharia

4-6 septiembre 2023



Libro de actas · Livro de atas

Título: Proceedings of the 12th Iberian Agroengineering Congress.
(Libro de actas del XII Congreso Ibérico de Agroingeniería)
(Livro de atas del XII Congreso Ibérico de Agroengenharia)

Editores: Manuel Pérez Ruiz, Gregorio Egea Cegarra, Luis Pérez Urrestarazu, Isabel Díaz de la Torre, Antonio Rodríguez Lizana, Antonio Franco Salas, Manuel Jesús González Ortega, Rocío Pineda Martos y Alejandro Prior Fernández. Universidad de Sevilla, España.

Publicado: Servicio de Publicaciones de la Consejería de Agricultura, Pesca, Agua y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía

Edita: Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Universidad de Sevilla.

Impresión: Gandulfo Impresores, S.L.

ISBN: 978-84-09-53018-2

Depósito Legal: SE 1503-2023

1ª Edición. Sevilla, 2023





Optimización del riego en la producción de tomate de industria en la Vega Media del Guadalquivir: análisis de la huella hídrica.....	727
Manejo del riego en el cultivo del almendro afectado por heladas.....	737
Adaptability of pitaya (<i>Hylocereus</i> spp.) to aquaponic production in the first stages of growth.....	747
Respuesta del pepino a recortes severos del riego antes de cosecha.....	755

Área temática: Tecnología de la Información, Control de Procesos y Automatización/ Tecnologia da Informação, Controlo e Automatização de Processos

Diseño y construcción de sensores de humedad de bajo coste para uso en riego: validación y comparación con sensores comerciales.....	765
Estimación de los niveles nutricionales de hojas de cítricos mediante análisis no destructivo aplicando técnicas de aprendizaje automático.....	773
Desarrollo de un sistema de detección de 4 tipos malezas en el cultivo de Maíz (<i>Zea mays</i> L.) bajo invernadero utilizando el modelo YOLOv5 v7.0.....	781

Área temática: Tecnología de la Producción Animal y Acuicultura/ Tecnologia de Produção Animal e Aquicultura

Validación de sistemas de posicionamiento en interiores para granjas lecheras. Estudio de caso.	793
Depurado de los registros de estaciones electrónicas de alimentación en porcino: estimaciones de eficiencia	803

Área temática: Tecnología de Poscosecha/ Tecnologia Pós-colheita

Aprovechamiento de residuos de aguacate para la obtención de octoxinoles y ácido cianúrico, y su valorización como biorracionales.....	813
Consecuencias ambientales de la extensión de la vida útil: envasado convencional versus activo para ensaladas.....	821
Encapsulación de extractos de <i>Uncaria tomentosa</i> en nanotransportadores para el control de <i>Botrytis cinerea</i> en fresa.....	829
Influencia de factores de cultivo y conservación en el contenido en azúcares reductores en patata.....	837
Determinación de la textura en caqui 'Rojo brillante' mediante imagen hiperspectral Vis-NIR.....	845
Uso de imagen hiperespectral para la discriminación en postcosecha de variedades similares de níspero.....	855

Área temática: Tecnología de Invernadero/ Tecnologia de estufas

Constituyentes fitoquímicos y actividad antimicrobiana de extractos de <i>Euphorbia serrata</i> L. para la protección de cultivos de <i>Borago officinalis</i> L.	865
Análisis de sistema de enfriamiento evaporativo en invernadero con sistema de distribución de aire.....	875
Ajuste y validación de un modelo dinámico de balance de energía para estimar la temperatura en un invernadero colombiano de cubierta plástica.	883
Evaluación experimental de un sistema de calefacción pasiva adaptado a un invernadero de cubierta plástica.....	893





Constituyentes fitoquímicos y actividad antimicrobiana de extractos de *Euphorbia serrata* L. para la protección de cultivos de *Borago officinalis* L.

E. Sánchez-Hernández¹, V. González-García², A. Palacio-Bielsa², J. Casanova-Gascón³, L.M. Navas-Gracia¹, J. Martín-Gil¹, y P. Martín-Ramos¹

¹ Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal, ETSIIAA, Universidad de Valladolid, 34004 Palencia; eva.sanchez.hernandez@uva.es (E.S.-H.); luismanuel.navas@uva.es (L.M.N.-G.); mgil@iaf.uva.es (J.M.-G.); pmr@uva.es (P.M.-R.)

² Departamento de Sistemas Agrícolas, Forestales y Medioambientales, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Instituto Agroalimentario de Aragón—IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza; vgonzalezg@aragon.es (V.G.-G.); apalaciob@aragon.es (A.P.-B.)

³ Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA), EPS, Universidad de Zaragoza, Carretera de Cuarte s/n 22071, Huesca; jcasan@unizar.es (J.C.-G.)

Abstract: The genus *Euphorbia* is widespread and possesses medicinal uses. However, there is no available phytochemical information on *Euphorbia serrata* L. This study investigates the composition of the hydromethanolic extract of its aerial parts and proposes its utilization for crop protection purposes, following integrated pest management guidelines. Gas chromatography-mass spectrometry results indicate that the primary phytochemicals include 3-methylbutyl formate, quinic acid, N1-(4-hydroxybutyl)-N3-methylguanidine acetate, and 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one, which have antimicrobial activity. Such activity was tested against four diseases of borage (*Borago officinalis* L.), namely *Pseudomonas cichorii*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, and *Sclerotinia sclerotiorum*. *In vitro* tests revealed minimum inhibitory concentrations (MICs) of 750 and 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ against the bacterium and the three fungal taxa, respectively. The antimicrobial activity was further enhanced by combining the extract with chitosan oligomers (COS), forming conjugate complexes, for which MIC values of 187.5, 750, 500, and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for *P. cichorii*, *B. cinerea*, *F. oxysporum*, and *S. sclerotiorum*, respectively, were obtained. Subsequently, these COS-*E. serrata* extract conjugate complexes were tested in *in vivo* assays against two of the pathogens, demonstrating a strong protective action on artificially inoculated plants at concentrations of 375 and 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for *P. cichorii* and *F. oxysporum*, respectively. These findings suggest that sawtooth spurge is a rich source of biorationals for crop protection applications.

Palabras clave: borraja; fitoquímicos; lechetrezna; protección de cultivos.

1. Introducción

Euphorbia serrata L. es una planta arvense anual que puede alcanzar los 0,7 m de altura. Se conoce como lechetrezna o tártago de hoja serrada por la forma dentada del borde de sus hojas. Al igual que otros miembros de la familia *Euphorbiaceae*, se considera tóxico y venenoso [1] porque exuda un látex irritante e inflamatorio cuando se rompen sus tallos u hojas. Sin embargo, según Alves *et al.* [2], su uso medicinal está documentado en el tratamiento de enfermedades de la piel, migrañas, parásitos intestinales, gonorrea, verrugas, asma, bronquitis y disentería.

Las revisiones del estado de conocimiento sobre el género *Euphorbia*, como las de Ernst *et al.* [3] y Jassbi [4], han puesto de relieve la necesidad de investigar los usos medicinales de estas plantas y su potencial como fuente de productos naturales bioactivos.





En consecuencia, el objetivo de este estudio es proporcionar información sobre los fitoquímicos de *E. serrata* y explorar posibles usos. En particular, teniendo en cuenta que los fitoquímicos presentes en otros miembros de la familia *Euphorbiaceae* han demostrado una fuerte actividad contra ciertos fitopatógenos [5], se ha investigado su aplicación para el control de cuatro patógenos de la borraja (*Borago officinalis* L.).

La importancia de este cultivo está aumentando en Aragón gracias a su promoción como parte de la cocina de vanguardia en restaurantes de alto nivel, tanto en España como en otros países. Sin embargo, su producción en el Valle del Ebro se ve amenazada por enfermedades como la marchitez y la podredumbre radicular causadas por *Fusarium oxysporum* Schltdl., un fitopatógeno que ha llegado a destruir el 70% de la cosecha en 2019 [6] y para el que aún no se dispone de métodos de control efectivos. Otros dos hongos patógenos polífagos, *Botrytis cinerea* Pers. (moho gris) y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (podredumbre blanda algodonosa) también afectan a este cultivo [7]. En cuanto a los patógenos bacterianos, *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp también supone una seria amenaza para la borraja, especialmente en condiciones de alta humedad como las del cultivo en invernadero [8].

El uso de biorracionales a partir de extractos de *E. serrata* para hacer frente a estas enfermedades puede ofrecer a los cultivadores de borraja una solución basada en productos naturales, que cumpla con los requisitos del artículo 14 de la Directiva Europea 2009/128/CE, susceptible también de aplicación a otros cultivos hortícolas que sufren el ataque de estos fitopatógenos.

2. Materiales y métodos

2.1. Muestras de plantas y reactivos

Las partes aéreas de plantas de *E. serrata* se recolectaron en mayo de 2022 en la Vía Verde del Canfranero, cerca de la ciudad de Huesca (42°08'38.7" N 0°26'54.0" O), durante la fase de plena floración. Se mezclaron muestras de 20 ejemplares para obtener muestras representativas. Las muestras compuestas se secaron a la sombra, se redujeron a polvo con una trituradora mecánica, se homogeneizaron y se tamizaron (malla de 1 mm).

Las plantas de borraja cv. "Movera" utilizadas en los experimentos *in vivo* fueron suministradas por Viveros Laraflor (Zaragoza).

El agar de triptona de soja (TSA) y el caldo de triptona de soja (TSB) se adquirieron de Sigma-Aldrich Química (Madrid), mientras que el caldo de dextrosa de patata (PDB) y el agar de dextrosa de patata (PDA) fueron suministrados por Becton Dickinson (Bergen County, NJ, EE.UU.). El quitosano de alto peso molecular se compró de Hangzhou Simit Chem. y Tech. Co. (Hangzhou, China). La enzima Neutrase™ 0,8 L se obtuvo de Novozymes A/S (Bagsværd, Dinamarca).

2.2. Fitopatógenos

Las cuatro cepas de *P. cichorii* (CITA Pci-2, CITA Pci-3, CITA Pci-4 y CITA Pci-5), obtenidas de plantas de borraja enfermas de la provincia de Zaragoza, fueron suministradas por el Laboratorio de Bacteriología del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA, Zaragoza) como subcultivos en TSA. El aislado fúngico de *B. cinerea* (CECT 20973) se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia). Los aislados fúngicos de *F. oxysporum* (MYC-1593) (aislado de plantas de borraja enfermas) y *S. sclerotiorum* (MYC-799) fueron facilitados por el Laboratorio de Micología del CITA como subcultivos en PDA.

2.3. Preparación del extracto de *E. serrata*, de los oligómeros de quitosano y de su complejo conjugado

Una muestra de la parte aérea seca (11,4 g) se mezcló con 90 mL de una solución de metanol/agua (5 mL de metanol y 85 mL de agua) y se calentó en un baño de agua a 50 °C durante





30 min, seguido de sonicación usando un ultrasonificador tipo sonda modelo UIP1000 hdT de Hielscher Ultrasonics (Teltow, Alemania). A continuación, la solución se centrifugó a 9000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se filtró a través de papel Whatman nº 1, seguido de liofilización para obtener el residuo sólido. El rendimiento de la extracción fue del 52,6% (6 g). Para el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), se disolvieron 25 mg del extracto liofilizado en 5 mL de metanol de grado HPLC para obtener una solución de 5 mg·mL⁻¹, que se filtró de nuevo.

Los oligómeros de quitosano (COS) se prepararon siguiendo el método descrito en [9], obteniéndose oligómeros con un peso molecular < 2.000 Da en una solución con un pH de 4,5. Se mezclaron soluciones de COS y extracto de *E. serrata* (150 mL de cada solución, ambas a una concentración de 3000 µg·mL⁻¹) en una proporción 1:1 (*v/v*) y se ultrasonificaron durante 15 minutos para formar los complejos conjugados.

2.4. Caracterización del extracto

Para elucidar los constituyentes del extracto hidrometanólico de partes aéreas de *E. serrata* se utilizó un cromatógrafo de gases modelo 7890A acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar modelo 5975C (ambos de Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). Esta caracterización fue realizada en los Servicios de Apoyo a la Investigación (STI) de la Universidad de Alicante. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: volumen de inyección = 1 µL; temperatura del inyector = 280 °C, en modo *splitless*; temperatura inicial del horno = 60 °C, mantenida durante 2 min, seguida de una rampa de 10 °C·min⁻¹ hasta una temperatura final de 300 °C, mantenida durante 15 min. Para la separación de los compuestos se empleó una columna cromatográfica HP-5MS UI (30 m de longitud, 0,250 mm de diámetro, película de 0,25 µm), también de Agilent Technologies. Las condiciones del espectrómetro de masas fueron: temperatura de la fuente de impacto de electrones del espectrómetro de masas = 230 °C, temperatura del cuadrupolo = 150 °C, y energía de ionización = 70 eV. La identificación de los componentes se basó en la comparación de sus espectros de masas y tiempos de retención con los de los compuestos auténticos y en el cotejo informático con la base de datos del National Institute of Standards and Technology (NIST11).

2.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro*

La actividad antibacteriana se evaluó según la norma M07-11 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), utilizando el método de dilución en agar para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Inicialmente, las colonias de *P. cichorii* se incubaron a 28 °C durante 24 h en TSB. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas, partiendo de una concentración de 10⁸ UFC·mL⁻¹, hasta alcanzar un inóculo final de 10⁴ UFC·mL⁻¹. La suspensión bacteriana se extendió sobre la superficie de placas de TSA a las que se había añadido previamente el extracto, a concentraciones de entre 62,5 y 1.500 µg·mL⁻¹. A continuación, las placas se incubaron a 28 °C durante 24 h. La CMI se determinó como la concentración más baja del extracto en la que no se observó crecimiento bacteriano. Todos los experimentos se repitieron tres veces, con tres placas por tratamiento y concentración.

La actividad antifúngica se determinó mediante el método de dilución en agar, de acuerdo con los procedimientos estándar de las pruebas de susceptibilidad antifúngica EUCAST. Se incorporaron alícuotas de solución madre al medio PDA para obtener concentraciones finales de entre 62,5 y 1500 µg·mL⁻¹. Se transfirieron tapones de micelio ($\varnothing = 5$ mm), procedentes del margen de cultivos de 1 semana de edad de *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* y *F. oxysporum*, al centro de placas de PDA con las concentraciones mencionadas de extracto (tres placas por tratamiento y concentración, con dos duplicados). Las placas se incubaron a 25 °C en la oscuridad durante una semana. El control consistió en sustituir el extracto por el disolvente utilizado para la extracción





(es decir, metanol:agua, 5:85 *v/v*) en el medio PDA. La inhibición del crecimiento micelial se estimó según la fórmula $((d_c - d_t) / d_c) \times 100$, donde d_c y d_t representan los diámetros medios de las colonias fúngicas de control y tratadas, respectivamente. Las concentraciones eficaces (CE_{50} y CE_{90}) se determinaron mediante análisis PROBIT en SPSS Statistics v.25 (IBM, Nueva York, NY, EE.UU.). El factor de sinergia (FS), que mide el grado de interacción, se estimó mediante el método de Wadley.

2.6. Ensayos *in vivo*

En los experimentos *in vivo* se utilizaron plantas de borraja cv. "Movera" para evaluar la eficacia del tratamiento más potente según los resultados de los ensayos *in vitro* (COS-*E. serrata*) contra *P. cichorii* y *F. oxysporum*. Los patógenos fueron inoculados artificialmente siguiendo los métodos descritos en [10] y [6], respectivamente. Se utilizaron múltiples macetas de 4 × 4 cm para cultivar las plantas de borraja empleando turba estéril como sustrato, con 5 plantas por tratamiento y patógeno; se realizaron dos repeticiones independientes. El tratamiento se aplicó a dos concentraciones (CMI y CMI×2, es decir, 187,5 y 375 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *P. cichorii*, y 500 y 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *F. oxysporum*). En el caso de *P. cichorii*, se aplicó mediante pulverización (3 mL por planta). Transcurridas 2 h, se inoculó una colonia aislada de *P. cichorii* en los folíolos más jóvenes, realizando 3-4 punciones con un alfiler entomológico estéril. Para el ensayo con *F. oxysporum*, el hongo se cultivó previamente en PDB en matraces de 250 mL durante 3 días a 25 °C en la oscuridad con agitación constante. A continuación, las raíces de borraja se sumergieron en una suspensión de 6×10^6 conidios·mL⁻¹ durante 2 min, y las plantas se transfirieron a las macetas de plástico con el sustrato esterilizado. Las plantas no inoculadas, rociadas con agua esterilizada o sumergidas en agua esterilizada, se utilizaron como controles negativos. Todas las plantas se incubaron en una cámara de crecimiento (25 °C, fotoperiodo de 16/8 h) durante 10 días.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización del extracto por GC-MS

Entre los cincuenta y tres fitocompuestos identificados en el extracto de partes aéreas de *E. serrata*, los más abundantes fueron: 3-metilbutil-formiato (15,5%); ácido quínico (14,4%), acetato de N1-(4-hidroxibutil)-N3-metilguanidina (5,3%), y 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona (o DDMP) (4%).

Análogos del 3-metilbutil-formiato han demostrado ser útiles para el manejo de enfermedades postcosecha. Por lo tanto, es previsible que los ésteres 3-metilbutilados de *E. serrata* puedan inducir la acumulación intracelular de ROS e inhibir el crecimiento del micelio y la esporulación conidial, como se ha demostrado para otros ésteres 3-metilbutilados contra *Penicillium expansum* Link, *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, *B. cinerea*, y *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. [11]. En cuanto al ácido quínico, se ha sugerido su empleo como agente antibacteriano en la conservación de alimentos [12]. Su efecto antibacteriano se atribuye a la modulación de las funciones de los ribosomas y de la síntesis de aminoacil-ARNt, la modificación de los niveles de glicerofosfolípidos y ácidos grasos, y la interrupción de la vía de fosforilación oxidativa, causando interferencias en la fluidez de la membrana [13]. El DDMP o 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona ha demostrado actividad antibacteriana contra *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.) y *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos) Willems et al. [14], y actividad antifúngica contra *Verticillium dahliae* Kleb., *Diaporthe amygdali* (Delacr.) Udayanga, Crous y K.D. Hyde, y *Phytophthora megasperma* Drechsler [15].

3.3. Actividad antimicrobiana *in vitro*





En cuanto a la actividad antibacteriana del extracto, se observaron algunas diferencias en cuanto a la sensibilidad al COS entre las cuatro cepas de *P. cichorii*, con valores de CMI que oscilaron entre 500 y 750 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Sin embargo, los valores de CMI obtenidos para el extracto de *E. serrata* (comparables/ligeramente superiores a los de COS) y el complejo conjugado COS-*E. serrata* (notablemente inferiores a los de COS y *E. serrata*, con valores de FS de entre 1,97 y 2,47) fueron los mismos para las cuatro cepas: 750 y 187,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente.

La Figura 1 resume los resultados de las pruebas de capacidad antifúngica. Los oligómeros de quitosano inhibieron el crecimiento micelial de *B. cinerea* y *S. sclerotiorum* a 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, y el de *F. oxysporum* a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. El extracto de *E. serrata* fue más eficaz, logrando la completa inhibición de los tres patógenos a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Sin embargo, la actividad antifúngica mejoró sustancialmente al ensayar el complejo conjugado COS-*E. serrata*, para el cual la inhibición completa se produjo a dosis de entre 500 y 750 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esta mejora de la actividad se cuantificó utilizando los valores de concentración efectiva (CE) de los productos bioactivos por separado y los de los complejos conjugados, obteniéndose los FS que se resumen en la Tabla 1. Dado que se obtuvieron valores próximos a 2 frente a los tres fitopatógenos, puede inferirse una clara acción sinérgica entre COS y el extracto también en términos de actividad antifúngica.

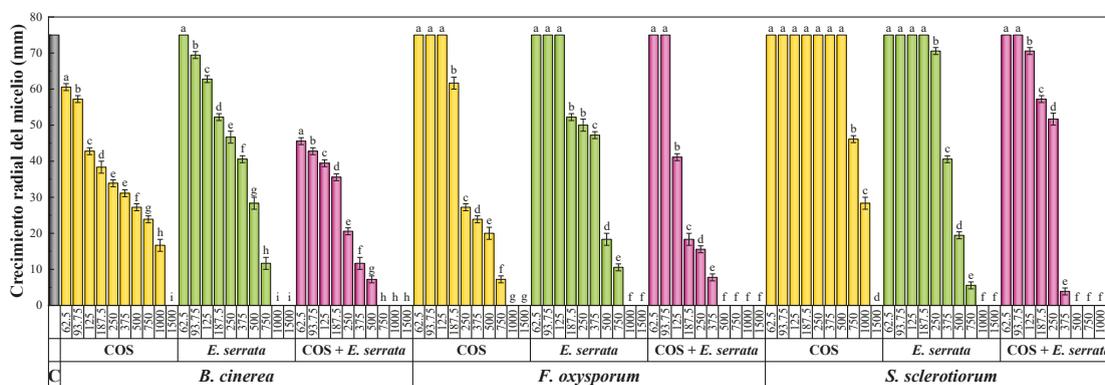


Figura 1. Inhibición del crecimiento radial del micelio de *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *S. sclerotiorum* en los ensayos *in vitro* realizados con oligómeros de quitosano (COS), extracto de parte aérea de *E. serrata* y su complejo conjugado (COS-*E. serrata*). La barra gris (C) representa los controles.

Tabla 1. Concentraciones efectivas (CE, expresadas en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de los oligómeros de quitosano (COS), el extracto de parte aérea de *E. serrata* y su complejo conjugado (COS-*E. serrata*) frente *B. cinerea*, *F. oxysporum*, y *S. sclerotiorum*. Los factores de sinergia (FS) para el conjugado COS-*E. serrata* se estimaron según el método de Wadley.

Patógeno	Tratamiento							
	COS		<i>E. serrata</i>		COS- <i>E. serrata</i>			
	CE ₅₀	CE ₉₀	CE ₅₀	CE ₉₀	CE ₅₀	FS	CE ₉₀	FS
<i>B. cinerea</i>	236,2	1426,3	402,2	832,4	140,0	2,13	500,6	2,10
<i>F. oxysporum</i>	233,2	743,4	402,1	796,2	142,4	2,07	378,4	2,03
<i>S. sclerotiorum</i>	864,3	1344,8	408,7	673,4	282,0	1,97	363,7	2,47

Estudios previos sobre la actividad antimicrobiana de *E. serrata* se han limitado a patógenos humanos, por lo que no es posible establecer comparaciones directas en términos de actividad. En cuanto a la actividad antimicrobiana de otros extractos de otras especies de *Euphorbia* contra patógenos vegetales, la actividad antibacteriana del extracto no conjugado de *E. serrata* sería comparable a la de *Euphorbia cotinifolia* L. [16]. En cuanto a su actividad antifúngica, sería sustancialmente superior a la de *Euphorbia hirta* L. y *Euphorbia tirucalli* L. frente a *F. oxysporum* [17-19]; superior a la de *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. y *Euphorbia royleana* Boiss. frente a otras





especies de *Fusarium* [20,21]; y comparable a la de *Euphorbia macroclada* Boiss. (para la cual se reportó una inhibición completa de *F. oxysporum* a $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para extractos en cloroformo, éter de petróleo y butanol) [22]. Por otra parte, las CMI obtenidas para el complejo conjugado son mejores que las de fungicidas convencionales como el Fosetyl-Al ($\geq 2000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y el Azoxystrobin ($> 62500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

3.4. Actividad antimicrobiana *in vivo*

3.4.1. Actividad antibacteriana *in vivo* frente a *P. cichorii*

Habida cuenta de que el complejo conjugado COS-*E. serrata* fue el más activo en los ensayos *in vitro*, se ensayó también *in vivo* como tratamiento preventivo contra el tizón bacteriano en plantas de borraja cv. "Movera" inoculadas artificialmente. Diez días tras la inoculación, las plantas de control positivo mostraron lesiones necróticas que cubrían toda la hoja (Figura 2b). Las plantas rociadas con el complejo conjugado COS-*E. serrata* a una concentración igual a la CMI ($187,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) presentaron lesiones necróticas en la zona donde se inoculó el patógeno, que no se extendieron a toda la hoja, aunque se observó cierta decoloración (Figura 2c). Las plantas tratadas con una dosis el doble de la CMI ($375 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) apenas mostraron signos de ataque de la enfermedad (Figura 2d), demostrando la efectividad del tratamiento.

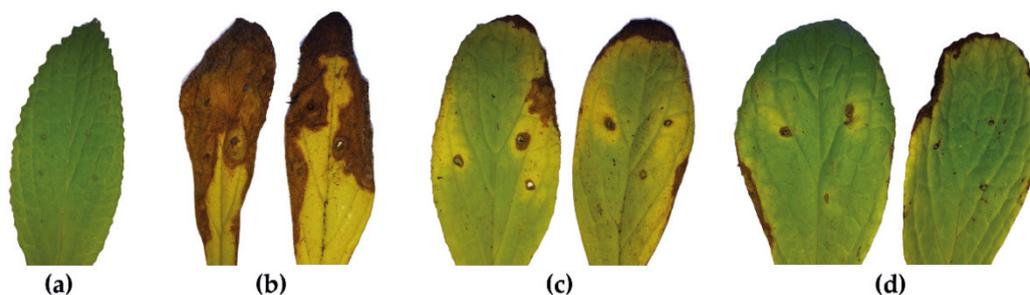


Figura 2. Síntomas del tizón bacteriano en plantas de borraja 10 días después de la inoculación en (a) plantas de control negativo; (b) plantas de control positivo; (c) plantas tratadas con el complejo conjugado COS-*E. serrata* a $187,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; y (d) plantas tratadas con el complejo conjugado COS-*E. serrata* a $375 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.4.2. Actividad antifúngica *in vivo* contra *F. oxysporum*

La Figura 3 muestra los resultados de los ensayos *in vivo* realizados con el complejo conjugado COS-*E. serrata* en plantas de borraja cv. "Movera" para evaluar la actividad protectora (fungistática) contra la marchitez por *Fusarium*. Todas las plantas del control positivo mostraron los síntomas característicos de marchitez severa y amarillamiento, acompañados de necrosis de las venas centrales de algunas hojas, seguida de la muerte de la planta (Figura 3b). La incidencia de la enfermedad entre las plantas tratadas con el extracto a una concentración igual a la CMI ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) fue alta (80%), pero la gravedad de la enfermedad fue menor (Figura 3c). Para lograr una protección completa, fue necesario aumentar la dosis a $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 3d). Cabe señalar que a la concentración más alta probada ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), las plantas de borraja no mostraron síntomas de fitotoxicidad, sin diferencias visuales respecto al control negativo (Figura 3a).

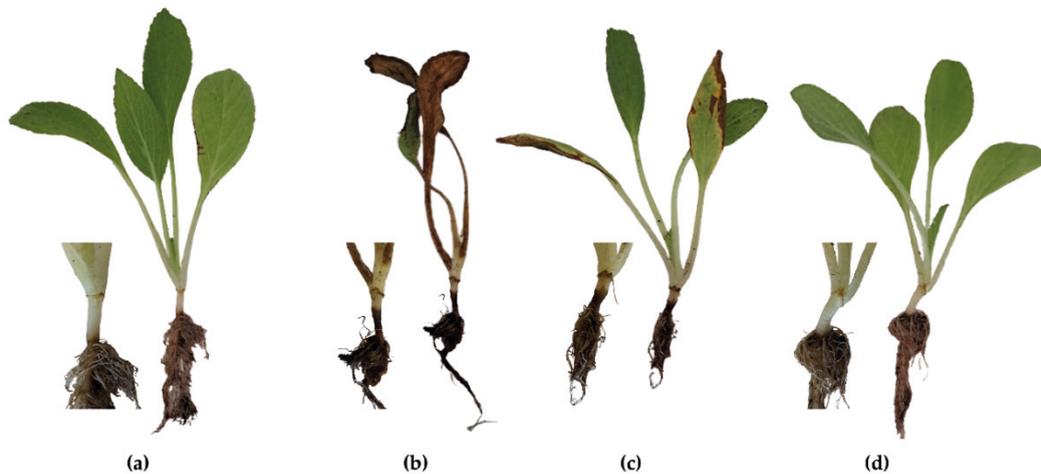


Figura 3. Síntomas de marchitez, pudrición del tallo y de la raíz producidos por *F. oxysporum* en plantas de borraja 10 días después de la inoculación en (a) plantas de control negativo; (b) plantas de control positivo; (c) plantas tratadas con el complejo conjugado COS-*E. serrata* a 500 µg·mL⁻¹; y (d) plantas tratadas con el complejo conjugado COS-*E. serrata* a 1000 µg·mL⁻¹.

4. Conclusiones

La caracterización por GC-MS del extracto hidrometanólico de *E. serrata* mostró que los principales constituyentes son el 3-metilbutil-formiato (15,5%), el ácido quínico (11,8%), el acetato de N1-(4-hidroxitil)-N3-metilguanidina (5,3%) y la 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona (o DDMP) (4%). Con vistas a su valorización para la protección de cultivos de borraja, se ensayó *in vitro* la actividad antimicrobiana del extracto frente a cuatro cepas de *P. cichorii*, y tres aislados de *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *S. sclerotiorum*. Se obtuvieron CMI's de 750 y 1000 µg·mL⁻¹ contra las bacterias y los tres hongos, respectivamente. Al conjugar el extracto con COS, la actividad antimicrobiana mejoró, obteniéndose CMI's de 187,5, 750, 500 y 500 µg·mL⁻¹ para *P. cichorii*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *S. sclerotiorum*, respectivamente. El tratamiento más efectivo (es decir, el complejo conjugado de extracto de COS-*E. serrata*) se probó además en ensayos *in vivo* contra los dos patógenos que actualmente tienen un mayor impacto en las principales zonas de cultivo de borraja en Aragón, confirmando una fuerte acción protectora frente a *P. cichorii* y *F. oxysporum* a dosis de 375 y 1000 µg·mL⁻¹, respectivamente. Por tanto, el extracto de *E. serrata* puede considerarse un biorracional para la gestión integrada de plagas de la borraja y otros cultivos hortícolas.

5. Agradecimientos

A P. Blasco y P. Candela, de los Servicio Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante, por la realización de los análisis de GC-MS. Esta investigación ha sido financiada por la Unión Europea a través del Programa Horizonte Europa (HORIZON-CL6-2022-FARM2FORK-01), con el proyecto 'Agro-ecological strategies for resilient farming in West Africa (CIRAWA)', ID 101084398.

Referencias

- Lewis, R.J. *Euphorbia serrata* latex. In *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials*, 11th ed.; John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, NJ, USA, 2004; 10.1002/0471701343.sdp12200p. 1737.
- Alves, A.L.V.; da Silva, L.S.; Faleiros, C.A.; Silva, V.A.O.; Reis, R.M. The role of ingenane diterpenes in cancer therapy: From bioactive secondary compounds to small molecules. *Natural Product Communications* **2022**, *17*, 1-30, doi:10.1177/1934578x221105691.





3. Ernst, M.; Grace, O.M.; Saslis-Lagoudakis, C.H.; Nilsson, N.; Simonsen, H.T.; Rønsted, N. Global medicinal uses of *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *176*, 90-101, doi:10.1016/j.jep.2015.10.025.
4. Jassbi, A.R. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1977-1984, doi:10.1016/j.phytochem.2006.06.030.
5. Zahid, K. Evaluation of antifungal activity of nine members of family Euphorbiaceae of Lahore Region against *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* & *Alternaria solani*. *American Journal of Biomedical Science & Research* **2019**, *6*, 216-220, doi:10.34297/ajbsr.2019.06.001032.
6. González, V.; Aguado, A.M.; Garcés-Claver, A. First report of *Fusarium oxysporum* causing wilt and root rot in common borage (*Borago officinalis*) in Spain. *Plant Disease* **2019**, *103*, 1774-1774, doi:10.1094/pdis-02-19-0259-pdn.
7. Garibaldi, A.; Pensa, P.; Bertetti, D.; Gullino, M.L. First report of white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on *Borago officinalis* in Italy. *Plant Dis.* **2008**, *92*, 1711-1711, doi:10.1094/PDIS-92-12-1711A.
8. Cambra, M.A.; Palacio-Bielsa, A.; López, M.M. Borage (*Borago officinalis*) is a new host of *Pseudomonas cichorii* in the Ebro Valley of Spain. *Plant Dis.* **2004**, *88*, 769-769, doi:10.1094/pdis.2004.88.7.769a.
9. Ruano-Rosa, D.; Sánchez-Hernández, E.; Baquero-Foz, R.; Martín-Ramos, P.; Martín-Gil, J.; Torres-Sánchez, S.; Casanova-Gascón, J. Chitosan-based bioactive formulations for the control of powdery mildew in viticulture. *Agronomy* **2022**, *12*, 495, doi:10.3390/agronomy12020495.
10. Sánchez-Hernández, E.; González-García, V.; Palacio-Bielsa, A.; Lorenzo-Vidal, B.; Buzón-Durán, L.; Martín-Gil, J.; Martín-Ramos, P. Antibacterial Activity of *Ginkgo biloba* Extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas* spp., and *Xanthomonas vesicatoria*. *Horticulturae* **2023**, *9*, 461-474.
11. Arrarte, E.; Garmendia, G.; Rossini, C.; Wisniewski, M.; Vero, S. Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. *Biological Control* **2017**, *109*, 14-20, doi:10.1016/j.biocontrol.2017.03.002.
12. Bai, J.; Wu, Y.; Zhong, K.; Xiao, K.; Liu, L.; Huang, Y.; Wang, Z.; Gao, H. A comparative study on the effects of quinic acid and shikimic acid on cellular functions of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.* **2018**, *81*, 1187-1192, doi:10.4315/0362-028x.Jfp-18-014.
13. Benali, T.; Bakrim, S.; Ghchime, R.; Benkhaira, N.; El Omari, N.; Balahbib, A.; Taha, D.; Zengin, G.; Hasan, M.M.; Bibi, S.; Bouyahya, A. Pharmacological insights into the multifaceted biological properties of quinic acid. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **2022**, *10.1080/02648725.2022.2122303*, 1-30, doi:10.1080/02648725.2022.2122303.
14. Sánchez-Hernández, E.; Buzón-Durán, L.; Cuchí-Oterino, J.A.; Martín-Gil, J.; Lorenzo-Vidal, B.; Martín-Ramos, P. Dwarf pomegranate (*Punica granatum* L. var. *nana*): Source of 5-HMF and bioactive compounds with applications in the protection of woody crops. *Plants* **2022**, *11*, 550-564, doi:10.3390/plants11040550.
15. Sánchez-Hernández, E.; Balduque-Gil, J.; González-García, V.; Barriuso-Vargas, J.J.; Casanova-Gascón, J.; Martín-Gil, J.; Martín-Ramos, P. Phytochemical Profiling of *Sambucus nigra* L. Flower and Leaf Extracts and Their Antimicrobial Potential against Almond Tree Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24*, 1154-1171, doi:10.3390/ijms24021154.





16. Jayalakshmi, B.; Raveesha, K.; Amruthesh, K. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Euphorbia cotinifolia* Linn. leaf extracts against phytopathogenic bacteria. *Journal of Pharmacy Research* **2011**, *4*, 3759-3762.
17. Mekam, P.N.; Martini, S.; Nguefack, J.; Tagliazucchi, D.; Stefani, E. Phenolic compounds profile of water and ethanol extracts of *Euphorbia hirta* L. leaves showing antioxidant and antifungal properties. *South African Journal of Botany* **2019**, *127*, 319-332, doi:10.1016/j.sajb.2019.11.001.
18. Shirazi, M.; Abid, M.; Hussain, F.; Abbas, A.; Sitara, U. Antifungal activity of some medicinal plant extracts against soil-borne phytopathogens. *Pakistan J Bot* **2020**, *52*, 685.
19. Upadhyay, R.R.; Ansarin, M.; Zarintan, M.H.; Shakui, P. Tumor promoting constituent of *Euphorbia serrata* L. latex. *Experientia* **1976**, *32*, 1196-1197, doi:10.1007/bf01927623.
20. Ashraf, A.; Sarfraz, R.A.; Rashid, M.A.; Shahid, M. Antioxidant, antimicrobial, antitumor, and cytotoxic activities of an important medicinal plant (*Euphorbia royleana*) from Pakistan. *Journal of Food and Drug Analysis* **2015**, *23*, 109-115, doi:10.1016/j.jfda.2014.05.007.
21. Salhi, N.; Mohammed Saghir, S.A.; Terzi, V.; Brahmi, I.; Ghedairi, N.; Bissati, S. Antifungal activity of aqueous extracts of some dominant Algerian medicinal plants. *BioMed research international* **2017**, 2017.
22. Al-Mughrabi, K. Antimicrobial Activity of Extracts from Leaves, Stems and Flowers of " *Euphorbia macroclada*" against plant pathogenic fungi. *Antimicrobial Activity of Extracts from Leaves, Stems and Flowers of " Euphorbia macroclada" against plant pathogenic fungi* 2003, 1000-1006.

