

INFORME TÉCNICO

Programa: Acciones de cooperación para el apoyo de proyectos piloto, desarrollo de nuevos productos, prácticas, procesos y tecnologías en el ámbito agroforestal (MR331A).

Proyecto: Evaluación como agente de biocontrol del extracto natural obtenido a partir del residuo del prensado de semillas de *Camellia* spp. en la producción de planta de vivero (FEADER 2021/019A).

Entidad solicitante: Galiplant Ornamental S.L.

Entidad colaboradora (Centro de investigación): Estación Fitopatológica Areeiro

Entidad colaboradora I: Fauna Útil S.L.

Índice

1. Resumen del proyecto	3
2. Introducción: estado del arte y necesidad del proyecto	3
3. Objetivos	5
4. Obtención de residuos de semillas de <i>Camellia</i> spp. y elaboración del extracto natural	6
5. Selección de cultivos a estudiar	9
6. Selección de patógenos a estudiar	10
7. Ensayos <i>in vitro</i> para evaluar la capacidad de control biológico del extracto frente a los patógenos seleccionados	16
8. Estudio de las plagas más relevantes en viveros	26
9. Ensayos para evaluar el potencial bioinsecticida del extracto	27
10. Ensayos <i>in vivo</i> para evaluar el potencial bioestimulante del extracto	29
11. Divulgación de los resultados	37
12. Conclusiones y perspectivas futuras	40
13. Referencias bibliográficas	41
Anexo I. Resultados de los análisis de los extractos	44
Anexo II. Actividades de divulgación de los resultados	54

1. Resumen del proyecto

En el presente proyecto se evaluó, en condiciones de laboratorio y en condiciones reales en campo, el potencial como agente de control biológico y bioestimulante del extracto obtenido a partir del residuo sólido resultante del prensado en frío de las semillas de *Camellia* spp. (70% *C. japonica* + 30% otras) en la extracción de aceite. Este residuo, en adelante denominado “torta de prensado” o “torta de semillas”, tiene un alto contenido en saponinas, sustancias naturales con propiedades bactericidas, fungicidas e insecticidas.

El estudio se realizó sobre pulgón, un insecto plaga frecuente en los cultivos estudiados, y sobre los hongos patógenos que se detectaron frecuentemente causando daños en la producción de plantel del vivero (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium* sp. y *Rhizoctonia solani*). Adicionalmente, se evaluó el potencial como agente de control biológico del extracto frente a dos patógenos de gran relevancia en cultivos de importancia económica en Galicia y disponibles en la colección de Fauna Útil S.L.: *Gnomoniopsis smithogilvyi*, enfermedad emergente que causa la pudrición de castañas, y *Neofusicoccum parvum*, hongo causante de enfermedad en madera de viña.

La evaluación de las propiedades bioestimulantes del residuo se realizó en dos grupos de cultivos: aromáticas (*Lavandula angustifolia*, *Rosmarinus officinalis*) y ornamentales (*Cyathea cooperi*, *Vinca minor*).

Con este estudio se pretende demostrar la eficacia y seguridad del extracto natural como agente de biocontrol y bioestimulante, definir su modo de acción y los efectos beneficiosos que presenta, y determinar las concentraciones óptimas que permitan desarrollar una estrategia a largo plazo para su uso en distintas formulaciones.

2. Introducción: estado del arte y necesidad del proyecto

El género *Camellia* (Ericales, Theaceae) incluye varias especies muy valoradas como cultivos ornamentales (*C. japonica* L.) o por los subproductos que se pueden obtener como el té (*C. sinensis* L.) o el aceite (*C. oleífera* Abel.) (Liang *et al.*, 2017; Namita *et al.*, 2012). Si bien *C. oleífera* es la especie más cultivada para la producción de aceite debido a su excelente rendimiento, las semillas de varias especies de *Camellia* también se pueden utilizar para producir aceites que son muy apreciados en la industria cosmética y alimentaria por sus múltiples beneficios (Liang *et al.*, 2017). El aceite obtenido de las semillas de *C. oleífera* se ha utilizado durante siglos en China para cocinar y como medicina para enfermedades estomacales y quemaduras (Lee and Yen, 2006; Liao *et al.*, 2017). El aceite de *C. sasanqua* Thunb. sirve como antiinflamatorio y el de *C. japonica* se usa como producto cosmético en Japón debido a sus propiedades beneficiosas para el cuidado de la piel y el cabello (Akihisa *et al.*, 1998, 2004; Feas *et al.*, 2013).

Aunque el aceite de camelia se emplea desde la antigüedad en los países asiáticos, en España, la pionera en la producción de aceite fue Galicia, donde se produce desde hace más de 10 años con fines cosméticos, siendo la Estación Fitopatológica Areeiro la precursora de este producto. Gracias a los estudios y trabajos realizados en este centro, la camelia que crece y florece en nuestros parques y jardines tiene muchas más posibilidades como cultivo, más allá del uso ornamental y paisajístico al que estábamos acostumbrados.

El proceso de extracción del aceite se realiza por prensado en frío de las semillas de *Camellia* spp., ya que sólo así se puede conservar el 100% de sus propiedades. En el proceso de prensado, se obtiene un residuo sólido llamado “torta de semillas” o “torta de prensado”. Este proceso genera un residuo sólido, aproximadamente 75 % del peso de la muestra procesada, que puede ser utilizado en la industria química y farmacéutica por su alto contenido de saponinas y otros metabolitos, como los flavonoides (Feng *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2006), ácidos grasos insaturados (Demirbas, 2010; Lin and Fan, 2011), polisacáridos (Jin, 2012; Xu *et al.*, 2016) y proteínas (Li *et al.*, 2015). Las saponinas son un grupo heterogéneo de glucósidos ampliamente distribuidos en el reino vegetal como metabolitos secundarios (Odufuwa *et al.*, 2013). Estos compuestos con características espumantes, poseen atributos tensoactivos y detergentes y se estudian ampliamente por sus propiedades fisicoquímicas y biológicas (antibacterianas, antifúngicas, antivirales e insecticidas) (Apers, *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2018; Sparg *et al.*, 2004).

En los últimos años, se han obtenido diferentes residuos ricos en saponinas mediante procesos de extracción de aceite por prensado en frío realizados en la Estación Fitopatológica Areeiro. Al tratarse de un residuo abundante después del prensado (75% residuo y 25% aceite) y, siendo conocedores de la posibilidad de valorizar un subproducto para promover la sostenibilidad y la economía circular en la industria del aceite de camelia, se puso en práctica un protocolo para la obtención de un extracto rico en saponinas.

Para la obtención del extracto crudo de saponinas se siguieron las condiciones de extracción y parámetros optimizados por Li, Haiyan y Yongzhong (2012). Para la caracterización química se llevó a cabo un ensayo preliminar y se analizó la composición química de tres extractos diferentes (EFA 130-519, EFA 965-975 y EFA 218-219) por parte de la empresa Global and Ecofriendly Natural Extracts S.L. (GLECEX). Los parámetros, tipo de ensayo y métodos analíticos empleados para caracterizar los extractos se indican en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Lista de parámetros, tipo de ensayo y métodos analíticos utilizados para caracterizar los extractos.

Parámetros	Ensayo	Método analítico
Contenido total de saponinas	Ensayo de la vainillina-ácido sulfúrico	Espectrofotometría
Contenido total de flavonoides	Ensayo del tricloruro de aluminio	Espectrofotometría
Contenido total de alcaloides	Ensayo del complejo del verde de bromocresol	Espectrofotometría
Contenido total de taninos	Ensayo de la vainillina	Espectrofotometría
Contenido total de proteínas	Método de Kjeldhal	Volumetría
Metales pesados	Cuantificación de metales pesados	ICP-MS*

*Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo.

La caracterización química indicó que el extracto en polvo tenía un alto contenido en saponinas (>280 mg/g), flavonoides (>22 mg/g) y taninos (>2,7 mg/g) (Salinero *et al.*, 2020). Estos tres grupos de metabolitos son compuestos con una amplia actividad antimicrobiana (Rodríguez *et al.*, 2000). No se detectaron alcaloides y, en el grupo de los metales pesados, sólo se observaron manganeso y zinc a niveles significativos. El contenido de proteínas varió significativamente entre las muestras, oscilando entre 19 mg/g (EFA 130-519) y más de 300 mg/g (EFA 218-219) (Salinero *et al.*, 2020).

Paralelamente, el extracto EFA 130-519 se evaluó *in vitro* frente a patógenos causantes de daños en cultivo: tres hongos (*Fusarium oxysporum* Schltdl., *Ilyonectria liriodendri* (Halleen, Rego & Crous) Chaverri & C. Salgado y *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn) y una bacteria (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Takikawa *et al.*). El estudio determinó que el extracto redujo el crecimiento de todos los hongos en todas las concentraciones testadas, pero su eficacia difirió entre ellos. A la concentración más alta (4%), los tres extractos registraron la máxima tasa de inhibición del crecimiento micelial para las tres especies fúngicas (Salinero *et al.*, 2020). Del mismo modo, estudios previos también demostraron la eficacia de los extractos ricos en saponinas obtenidos de las semillas de *Camellia* frente a hongos patógenos (Kuo *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2000;).

En los últimos años, la aplicación de productos químicos para el control de plagas y enfermedades en las plantas se ha reducido significativamente. En consecuencia, es necesario encontrar otras opciones para reducir el impacto de estos organismos fitófagos y fitopatógenos. El uso de bioproductos desarrollados a partir de extractos de plantas para el control de plagas y enfermedades parece ser una alternativa prometedora debido a su alta efectividad, bajo coste e inocuidad para el medio ambiente (Rodríguez *et al.*, 2000; Wink, 1988). Actualmente, hay registrados extractos de otras plantas con una elevada concentración de saponinas vegetales, moléculas que podemos encontrar en el datilero del desierto (*Balanites aegyptiaca* (L.) Delile), el velo de novia (*Gypsophila paniculata* L.) y la flor de loto (*Nelumbo nucifera* Gaertn.), entre otros (Proguard Inc., 1997).

Basándonos en los estudios previos realizados, consideramos que el extracto de *Camellia* puede ser una alternativa al uso de plaguicidas en algunos cultivos, sólo o combinado con otros ya existentes. Es un extracto vegetal de un subproducto accesible y de proximidad, 100% natural y 100% gallego, que puede representar una fuente sostenible para obtener saponinas, valorizando un residuo y favoreciendo la economía circular, una medida respetuosa con el medio natural para dar respuesta a un sector productivo que necesita herramientas para proteger los cultivos y mantener producciones de calidad con el mínimo residuo.

3. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto fue obtener un extracto natural rico en saponinas a partir de la recuperación del residuo sólido resultante del prensado en frío de las semillas de *Camellia* spp. (70% *C. japonica* + 30% otras) en la extracción del aceite, evaluar su actividad como bioestimulante y agente de control de plagas y enfermedades vegetales, y estudiar la viabilidad y seguridad de las formulaciones desarrolladas para el sector viverístico. Adicionalmente, se evaluó el potencial como agente de control biológico del extracto frente a otras enfermedades relevantes actualmente en el ámbito de la castañicultura y la vitivinicultura, dos sectores de gran importancia económica en Galicia.

Los objetivos específicos consistieron en estudiar los diferentes recursos que pueden ofrecer las especies del género *Camellia* como cultivo, proporcionando un valor añadido a un cultivo ya existente en Galicia al proponer la recuperación de un residuo natural, optimizando la sostenibilidad y la circularidad en la industria de producción de aceite. La transformación del extracto en un bioformulado necesario para el sector productivo, que

permita reducir el impacto de la producción agrícola y favorezca la reactivación económica y social de zonas rurales, y la evaluación del uso potencial y comercial de las saponinas procedentes de *Camellia* gallega, junto con su registro como producto recuperable y útil, conforman el objetivo final del trabajo.

4. Obtención de residuos de semillas de *Camellia* spp. y elaboración del extracto natural

Para la obtención de los extractos ricos en saponinas se siguieron las condiciones de extracción y parámetros optimizados por Li, Haiyan y Yongzhong (2012), partiendo de los residuos sólidos resultantes del prensado en frío de las semillas de *Camellia* spp. para la extracción de aceite (**Fig. 1**).

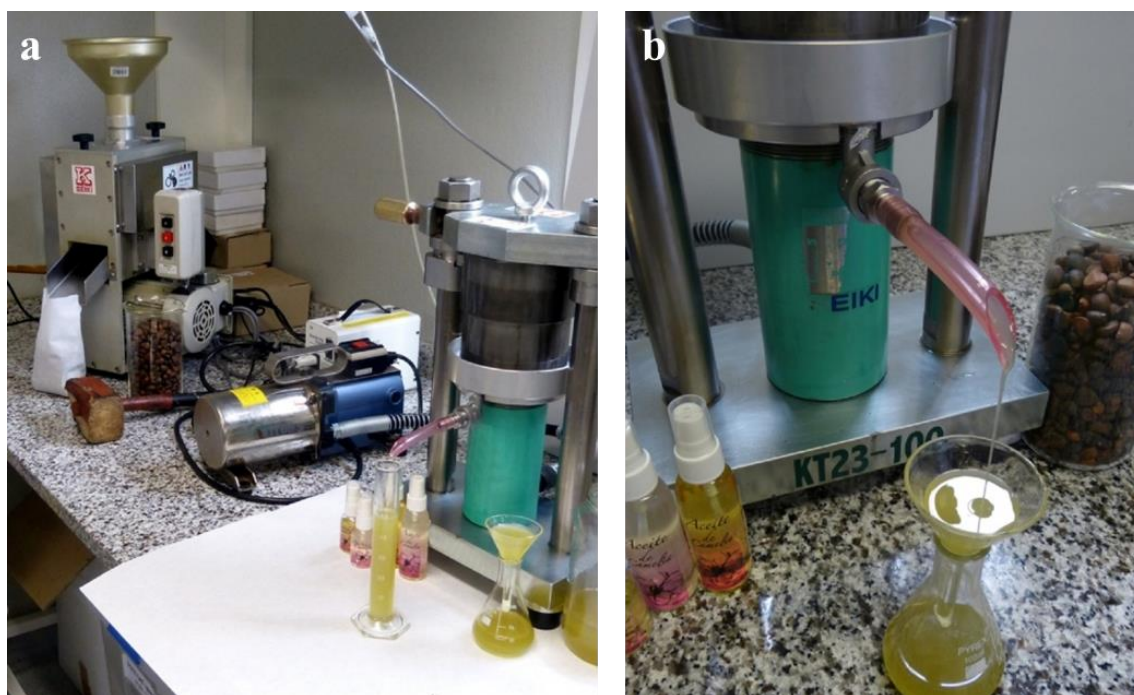


Fig. 1. a) máquina de prensado en frío; b) extracción de aceite de semillas de *Camellia*.

Se seleccionaron varias muestras de residuos de semillas, en forma de “torta de prensado” o “torta de semillas”, después de la extracción de aceite de una mezcla de especies de *Camellia* (principalmente *C. japonica*), se desmenuzaron manualmente, se pesaron y se colocaron en una bolsa de TNT (**Fig. 2**).



Fig. 2. a) semillas de *Camellia*; b) residuo de semillas después de la extracción de aceite (“torta de prensado” o “torta de semillas”); c) residuo de semillas desmenuzado dentro de la bolsa de TNT, listo para iniciar el proceso de obtención del extracto rico en saponina.

Cada bolsa se insertó en un bidón de plástico con boca ancha y tapa de rosca y luego se agregó agua potable, manteniendo la proporción de 6 L por cada kg de muestra (**Fig. 3c-d**). El recipiente se mantuvo tapado a temperatura ambiente durante 24 horas para completar la extracción sólido-líquido. Luego, el extracto acuoso se filtró dos veces: una con filtro de 50 μm y otra con filtro de 10 μm (**Fig. 3e-f**). El extracto filtrado se vertió (**Fig. 3h**) en bandejas de acero inoxidable provistas de papel de horno o lámina de silicona (**Fig. 3g**), que se introdujeron en una estufa de secado a 60-70°C (**Fig. 3i**) durante 3-4 días para evaporar el agua (el tiempo y la temperatura dependen del volumen de extracto que se ponga en cada bandeja de la estufa). Posteriormente, se deja enfriar y se retira el residuo seco de las bandejas (**Fig. 3j-k**), pesándolo para calcular el rendimiento del proceso. El extracto sólido obtenido fue homogeneizado, triturado y/o pulverizado (**Fig. 3l**) para su uso en los ensayos de bioactividades, análisis químicos, etc. Los extractos se almacenaron en envases codificados a temperatura ambiente.

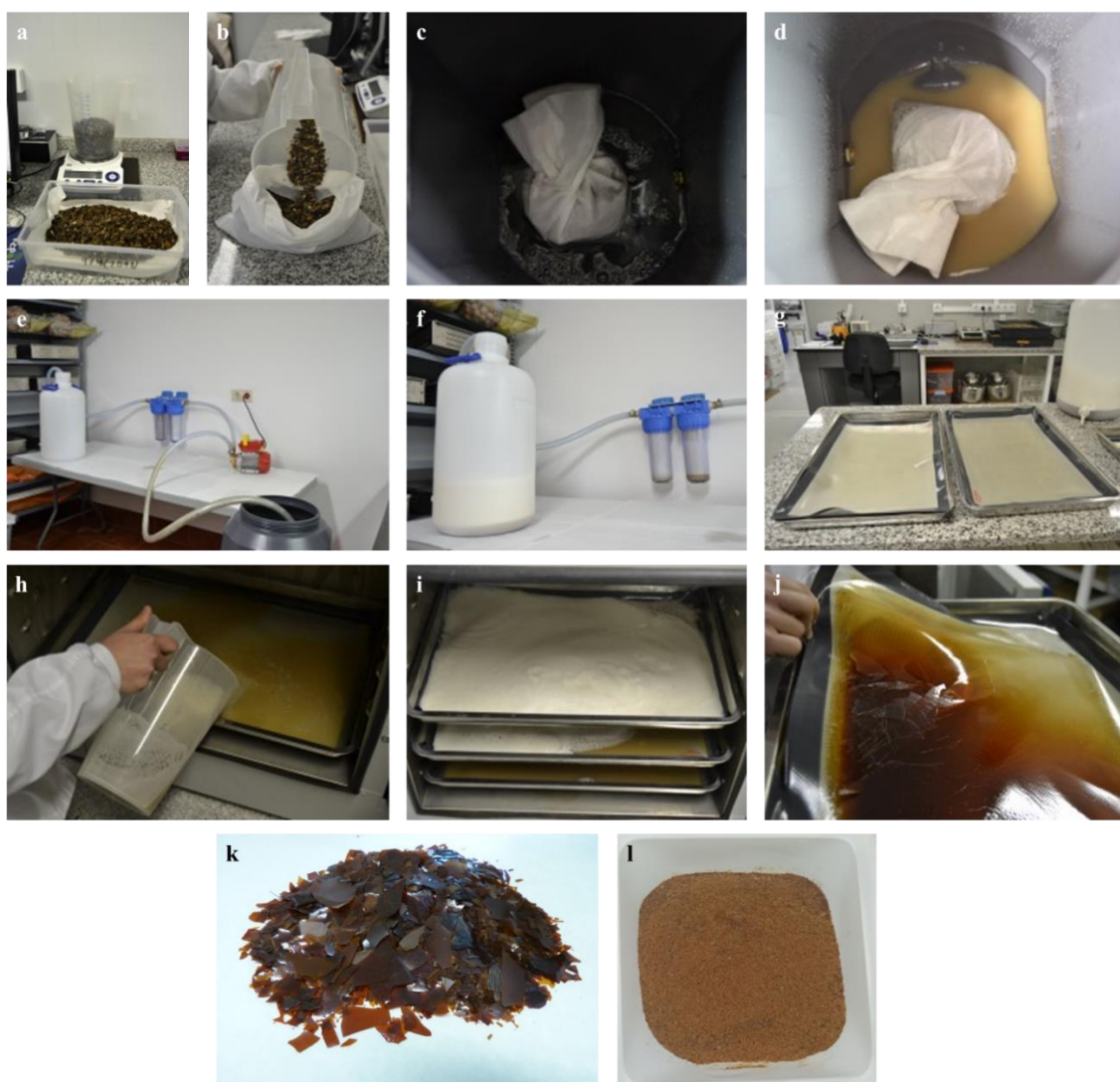


Fig. 3. Preparación de extractos: a) pesado del residuo; b) bolsa con residuo; c) residuo sumergido en agua; d) torta sumergida; e) filtrado; f) detalle del filtrado; g) bandejas; h) llenado de bandejas; i) bandejas en estufa de secado; j-k) extracto sólido; l) extracto pulverizado.

Cabe destacar que este procedimiento es largo y no presenta unos rendimientos elevados (Tabla 2).

Tabla 2. Rendimiento de los extractos obtenidos.

CÓDIGO	MUESTRA	PESO SEMILLA	RENDIMIENTO
Cod. 23-21	<i>Camellia japonica</i>	1053,01 g + 6 L agua (3 días - 60°C - 79,05 g)	7,50%
Cod. 22-20	<i>Camellia</i> mezcla	1023,75 g + 6 L agua (3 días - 60°C - 111,24 g)	10,90%
Cod. 28-21	<i>Camellia</i> mezcla	1011,1 g + 6 L agua (2 días - 70°C - 111,10 g)	11,00%
Cod. 32-21	<i>Camellia japonica</i>	1001,8 g + 6 L agua (2 días - 70°C - 69,44 g)	6,90%
Cod. 21-20	<i>Camellia japonica</i>	1017,22 g + 6 L agua (3 días - 60°C - 72,30 g)	7,11%
Cod. 24-21	<i>Camellia</i> mezcla	1030,30 g + 6 L agua (3 días - 60°C - 109,34 g)	10,60%
Cod. 25-21	<i>Camellia japonica</i>	1028,97 g + 6 L agua (3 días - 60°C - 77,55 g)	7,50%
Cod. 26-21	<i>Camellia</i> mezcla	1037,6 g + 6 L agua (3 días - 60°C - 107,67 g)	10,40%

Adicionalmente, se prepararon más extractos a partir del residuo obtenido en el prensado en frío de semillas de *Camellia* con otro tipo de máquina, que genera residuos cilíndricos en lugar de “torta de prensado” o “torta de semillas”, y del residuo procedente de la decantación de los restos que quedan en la prensa. Al contrario que el procedimiento descrito anteriormente para la elaboración de extractos, estos residuos sólo fueron sometidos a un triturado y/o pulverizado, lo que maximiza el rendimiento del proceso.

Para la caracterización química, se seleccionó un extracto obtenido por cada uno de los tres métodos descritos previamente, siendo CJ el extracto elaborado a partir de la torta, AC el extracto procedente de los residuos cilíndricos y DE el extracto originado a través de la decantación. La composición química de estos tres extractos diferentes (CJ, AC y DE) fue analizada por parte de la empresa Global and Ecofriendly Natural Extracts S.L. (GLECEX). Los parámetros, tipo de ensayo y métodos analíticos empleados para caracterizar los extractos se indican en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Lista de parámetros, tipo de ensayo y métodos analíticos utilizados para caracterizar los extractos.

Parámetros	Ensayo	Método analítico
Contenido total de saponinas	Ensayo de la vainillina-ácido sulfúrico	Espectrofotometría
Contenido total de flavonoides	Ensayo del tricloruro de aluminio	Espectrofotometría
Contenido total de taninos	Ensayo de la vainillina	Espectrofotometría
Contenido total de compuestos polifenólicos	Ensayo de Folin Ciocalteu	Espectrofotometría
Contenido total de proteínas	Método de Kjeldhal	Volumetría
Metales pesados	Cuantificación de metales pesados	ICP-MS*

*Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo.

La caracterización química indicó que los extractos tienen un alto contenido en saponinas (>140 mg/g) y flavonoides (>20 mg/g). Estos grupos de metabolitos son

compuestos con una amplia actividad antimicrobiana (Rodríguez *et al.*, 2000). No se detectaron alcaloides y, en el grupo de los metales pesados, sólo se observaron manganeso y selenio a niveles significativos. Estos resultados pueden verse resumidos en la **Tabla 4** o consultarse en el Anexo I de la memoria.

Tabla 4. Valor de los parámetros utilizados para caracterizar los extractos.

Parámetro	CJ	AC	DE
Contenido total de saponinas (mg/g)	442	141	164
Contenido total de flavonoides (mg/g)	21	31	23
Contenido total de taninos (mg/g)	2.2	0.7	0.3
Contenido total de compuestos polifenólicos (mg/g)	20	12	15
Contenido total de proteínas (g/100g)	31.3	6.2	12.8
Metales pesados (mg/kg)			
Hg	< 0.010	< 0.010	< 0.010
Pb	1.5 ± 0.4	< 0.010	0.077 ± 0.031
Cd	0.031 ± 0.008	0.027 ± 0.007	0.044 ± 0.011
As	0.020	< 0.010	0.040
Sb	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Ni	7.0	1.7	3.7
Cr	1.3	0.86	1.5
Mn	88.9	117.5	64.0
Zn	< 0.20	5.6	< 0.20
Se	71.9	< 0.080	18.2
Co	0.10	< 0.20	0.036

Los distintos métodos desarrollados en este trabajo permiten obtener extractos con alto contenido en saponinas (>140 mg/g) y flavonoides (>20 mg/g) a partir de semillas de *Camellia* (principalmente *C. japonica*) y sin utilizar ninguna sustancia química.

5. Selección de cultivos a estudiar

Inicialmente se realizó un estudio general de los problemas fitosanitarios asociados al vivero, para lo cual se monitorizaron y muestrearon los diferentes cultivos de Galiplant Ornamental S.L. (**Fig. 4**), tal cómo se describe en los apartados 6 y 8 de la presente memoria.



Fig. 4. Instalaciones de Galiplant Ornamental S.L.

Para la evaluación de las propiedades bioestimulantes y bioprotectoras de los extractos de *Camellia* desarrollados, se seleccionaron dos grupos de cultivos: aromáticas (*Lavandula angustifolia* Chaix ex Vill. Mill., *Rosmarinus officinalis* (L.) Schleid.) y ornamentales (*Cyathea cooperi* (Hook. ex F.Muell.) Domin, *Vinca minor* L.), ambos con problemática fitosanitaria asociada y registrada en el vivero productor.

Las plantas aromáticas sufren problemas causados por diversas plagas como el pulgón (Aphididae), que causa deformación y marchitamiento de hojas, además de la reducción del crecimiento de la planta y la aparición de negrilla por la melaza que secretan, la araña roja (*Tetranychus urticae* Koch), que provoca decoloración y desecación en las hojas, o la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius), un insecto temido por su alta resistencia a diversos insecticidas y su tendencia a transmitir virus. Además, estos cultivos presentan una alta incidencia de hongos como *Botrytis cinerea* Pers., entre otros, que causan la pudrición y necrosis de la parte aérea. Estas plantas se producen en invernadero todo el año, durante todo el ciclo, siguiendo un manejo integrado de plagas (IPM), pero hay una necesidad de minimizar los residuos en este grupo de cultivos.

El helecho arborescente *Cyathea cooperi* necesita unas condiciones de humedad y temperatura elevadas para su cultivo, lo que favorece una excesiva proliferación de cochinilla algodonosa (*Planococcus citri* Risso). Estos insectos se alimentan de las partes aéreas de la planta, dificultando el crecimiento y provocando deformaciones o amarillamiento de las hojas, causando defoliación y disminución de la fotosíntesis. Además, la secreción blanca y cerosa que producen las cochinillas disminuye considerablemente el valor ornamental de las plantas afectadas. Por otro lado, *Cyathea cooperi* sólo tolera el jabón potásico, ya que todos los demás tratamientos causan deformaciones, quemaduras y abortos de ramas, por lo que es importante desarrollar nuevos productos tolerables para la especie.

Vinca minor, una ornamental tapizante, presenta problemas de podredumbres radiculares y de cuello, patología causada por el hongo *Rhizoctonia* spp., la enfermedad que más bajas provoca en este cultivo en la plantación actual de Galiplant Ornamental S.L. Además, la *Vinca* no responde bien a los fungicidas químicos y, al cultivarse junto a plantas aromáticas, surge la necesidad de emplear alternativas de control de enfermedades sin productos químicos.

6. Selección de patógenos a estudiar

Durante el desarrollo del proyecto, se monitorizaron y muestrearon las parcelas de Galiplant Ornamental S.L. para detectar los patógenos fúngicos con mayor incidencia en los cultivos. Los síntomas más abundantes en las parcelas estudiadas fueron principalmente daños foliares (**Fig. 5**) y damping-off (**Fig. 6**).

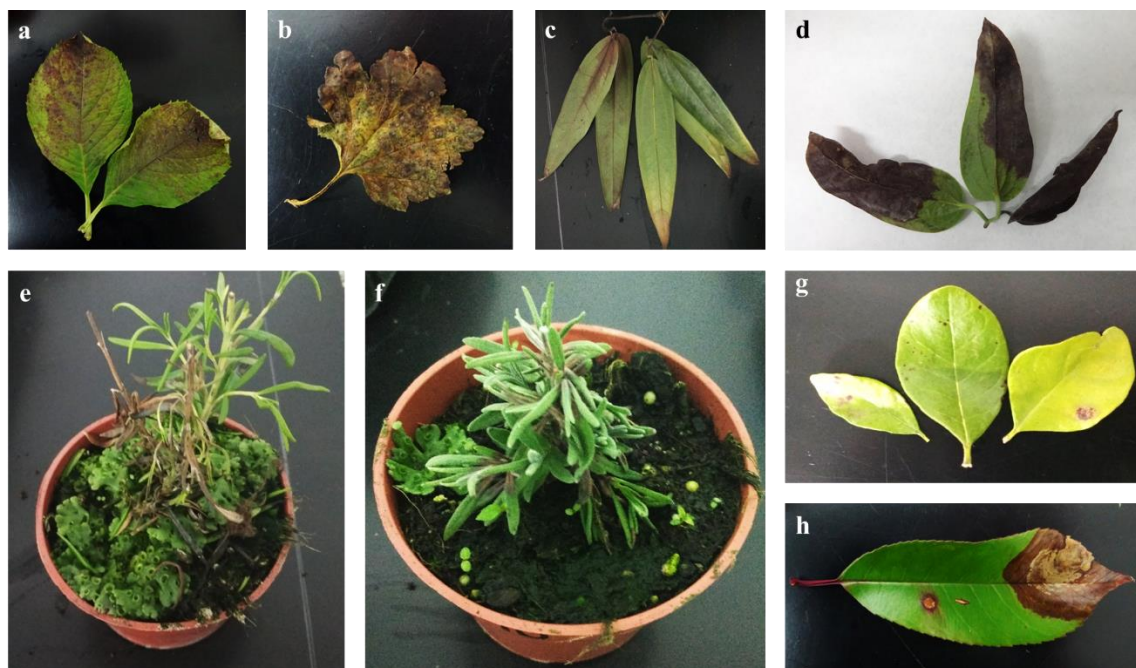


Fig. 5. Cultivos de Galiplant Ornamental S.L. con síntomas foliares de enfermedades fúngicas: a) hortensia (*Hydrangea* sp.); b) grosella roja (*Ribes rubrum* L.); c-d) clemátides (*Clematis* spp.); e) romero (*Rosmarinus officinalis*); f) lavanda (*Lavandula angustifolia*); g) feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret); h) fotinia (*Photinia* sp.).

El damping-off es una enfermedad común asociada a patógenos edáficos, que implica la reducción de la germinación y de la emergencia de plántulas, la pudrición y el colapso de las plantas al nivel del suelo, y representa uno de los mayores problemas fitosanitarios en viveros, pudiendo alcanzar pérdidas de más del 50% en casos graves. Aunque el damping-off puede ser causado por diversos tipos de estreses bióticos y abióticos, la mayoría de daños son producidos por hongos y oomicetes que afectan a una amplia variedad de cultivos frutícolas, hortícolas, ornamentales y forestales y, cuya amplia gama de huéspedes favorece su longevidad y persistencia en los suelos (Kelley & Oak, 1989; Lockwood, 1986).

Existen diversos estudios científicos que citan numerosas especies de hongos y oomicetes causantes de damping-off en diferentes cultivos, siendo *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp. las especies más frecuentemente asociadas con esta problemática. La mayoría de estos patógenos son comunes en suelos y pueden ser dispersados a través del agua por el riego o la lluvia, la contaminación del suelo por el uso de herramientas mal desinfectadas o la introducción de plantas infectadas, entre otros. Además, una vez establecidos, estos microorganismos pueden sobrevivir durante muchos años en el suelo, incluso en ausencia de plantas hospedantes, como saprofitos o formando estructuras de resistencia capaces de soportar condiciones adversas (Kelley & Oak, 1989; Lockwood, 1986).

Además de los elevados costes económicos que provoca esta enfermedad, también debe tenerse en cuenta el impacto medioambiental que supone el uso extendido de fungicidas para tratar este problema, que ha causado el desarrollo de aislados resistentes a los fungicidas y que suponen un reto adicional para su tratamiento. Es necesario

desarrollar alternativas sostenibles para el tratamiento de esta importante enfermedad, combinando medidas preventivas, buenas prácticas culturales y tratamientos respetuosos con el medio ambiente (Lamichhane *et al.*, 2017; Panth *et al.*, 2020). En esta línea, el presente proyecto supone una gran fuente de conocimiento respecto a esta problemática, permitiendo avanzar en el desarrollo de nuevas estrategias sostenibles para el control de esta grave enfermedad.

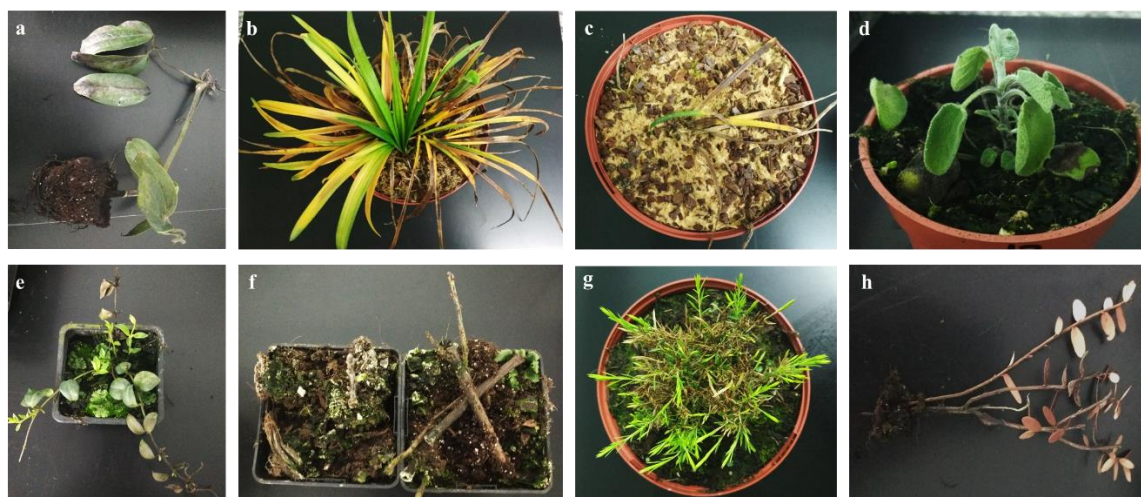


Fig. 6. Cultivos de Galiplant Ornamental S.L. con síntomas de damping-off: a) clemátide (*Clematis* sp.); b-c) liriope (*Liriope* spp.); d) salvia (*Salvia officinalis* L.); e) vinca (*Vinca minor*); f) grosella roja (*Ribes rubrum* L.); g) diosma (*Diosma* sp.); h) arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon* Aiton).

Las plantas afectadas fueron llevadas a las instalaciones de Fauna Útil S.L. para su estudio. Una vez en laboratorio, las muestras se fotografiaron haciendo hincapié en los síntomas y se seleccionaron varias partes para su siembra en medio de cultivo y para su incubación en cámara húmeda. Las muestras que se sembraron en medio fueron previamente desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito sódico al 1% durante 1 minuto y, posteriormente, se lavaron dos veces con agua destilada durante al menos 5 minutos, se secaron con papel secante y se etiquetaron. Las muestras que se incubaron en cámara húmeda fueron hidratadas en un vaso con agua e introducidas en una caja estéril con papel de filtro humedecido en su base.

Las muestras se sembraron bajo condiciones estériles en una cámara de flujo laminar en medio de cultivo. El medio usado fue AM (Agar malta) con estreptomycin 0,5 g/L (AMs), el medio comúnmente usado para la detección de hongos. Las muestras se cortaron en fragmentos pequeños de aproximadamente 1 cm y se sembraron entre 5-10 fragmentos por placa. Las placas se incubaron en oscuridad a 24°C.

Transcurridas 24-48 horas, los hongos se transfirieron a PDA (Agar de patata y dextrosa) fresco y se identificaron morfológicamente a nivel de género. Para el estudio morfológico se registraron, para cada aislado, caracteres macroscópicos del micelio como forma de colonia, color, textura, y microscópicos como tamaño y forma del micelio y tamaño, forma y color de las conidias utilizando un microscopio Nikon Eclipse E600 y se compararon con diferentes claves fúngicas taxonómicas.

Las cepas aisladas se mantienen en estufa a 24°C y en nevera, repicándose periódicamente a PDA. Para su conservación a largo plazo, se tomó una alícuota del cultivo monospórico y se colocó sobre papel de filtro estéril en placa PDA. Transcurridas 48 horas de incubación, se extrajo el papel en una campana de flujo laminar, se cortó en pequeños fragmentos y se introdujeron en seis tubos eppendorf, previamente autoclavados, por aislado. Cada tubo se etiquetó con su código correspondiente y la fecha. Estos tubos se guardaron en caja en nevera.

Estos aislados fueron llevados al laboratorio de biología molecular de la Estación Fitopatológica Areeiro para su identificación a nivel de especie por técnicas moleculares. Estas cepas se hicieron crecer sobre papel de celofán autoclavado en PDA para facilitar las labores de extracción.

El análisis molecular se realizó mediante amplificación, secuenciación y filogenia de diferentes regiones fúngicas según el género al que perteneciese el aislado en estudio. El ADN genómico se extrajo a partir de colonias puras de 7 días crecidas en medio de cultivo PDA usando el kit comercial E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-tek) siguiendo el protocolo corto. Para los estudios preliminares moleculares se amplificó la región ITS utilizando los iniciadores ITS1F (Gardes & Bruns, 1993) e ITS4 (White *et al.*, 1990). Adicionalmente, se amplificaron y secuenciaron otros marcadores moleculares: ITS, beta-tubulina, factor de elongación 1-alpha e histona (**Tabla 5**).

Tabla 5. Iniciadores de las regiones ITS, beta-tubulina, factor de elongación 1-alpha e histona utilizados en este estudio.

Región	Nombre iniciador	Referencia
ITS	ITS1F	Gardes & Bruns (1993)
	ITS4	White <i>et al.</i> (1990)
Beta-tubulina	T1	O'Donnell & Cigelnik (1997)
	BT2B	Glass & Donaldson (1995)
Factor de elongación 1-alpha	EF1	Geiser <i>et al.</i> (2004)
	EF2	Geiser <i>et al.</i> (2004)
	EF1-728F	Carbone & Kohn (1999)
Histona	H3-1b	Glass & Donaldson (1995)
	CYLH3F	Crous <i>et al.</i> (2004)

Las regiones seleccionadas se amplificaron en un termociclador SureCycler 8800 thermal cycler (Agilent Technologies). Los productos de PCR se separaron en un gel de electroforesis al 2% (w/v) en TBE 0.5X, teñido con Midori Green (NIPPON Genetics, Europe), y fueron examinados bajo luz ultravioleta. Los productos de PCR fueron purificados con Ilustra ExoProStar 1-Step kit (GE Healthcare Life Sciences). Los amplicones obtenidos fueron secuenciados en ambas direcciones (forward and reverse) usando los dos iniciadores con el Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) en el analizador genético ABIPrism 3500 Genetic Analyzer. Se obtuvo la secuencia consenso con el software Mega V.7 y se comparó con las secuencias homólogas usando la aplicación de búsqueda BLASTn de la base de datos nucleotídica NCBI Genbank. Posteriormente, se realizó un análisis mono o multi filogenético para cada aislado analizado según los loci utilizados en el proceso de identificación molecular.

Se detectaron hongos pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Colletotrichum* o *Pestalotiopsis*, entre otros, causantes de síntomas foliares (**Fig. 7**) y hongos y oomicetes pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium* o *Rhizoctonia*, causantes de damping-off (**Fig. 8**).

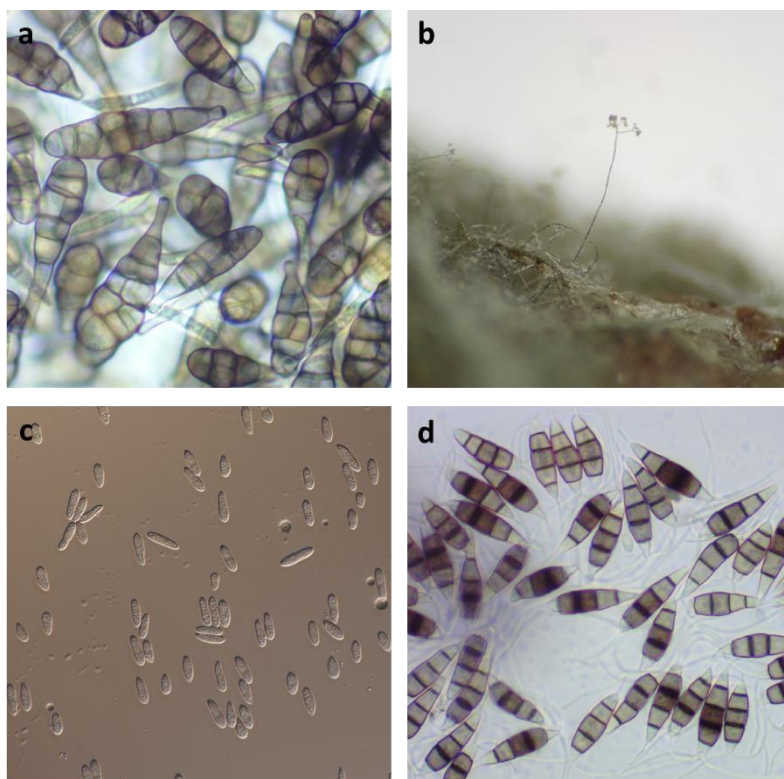


Fig. 7. Estructuras microscópicas de los hongos causantes de síntomas foliares: a) conidios de *A. alternata*; b) conidióforo de *Botrytis cinerea*; c) conidios de *Colletotrichum fioriniae*; d) conidios de *Pestalotiopsis sp.*

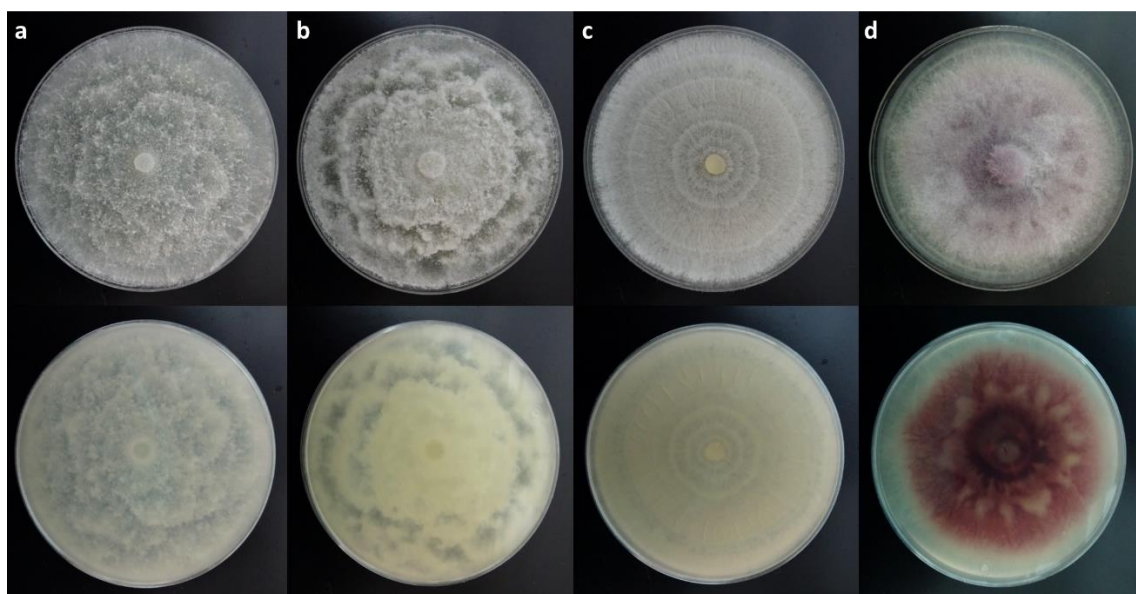


Fig. 8. Colonias de hongos y oomicetes fitopatógenos causantes de damping-off en medio PDA: a) *Pythium sp.*; b) *Phytophthora cinnamomi*; c) *Rhizoctonia solani*; d) *Fusarium oxysporum*.

Adicionalmente, dada la disponibilidad de otros patógenos, relevantes para los sectores de la castañicultura y la viticultura gallegos, que fueron aislados en trabajos previos y conservados en el banco de hongos del centro de investigación colaborador, se ampliaron los estudios para evaluar la eficacia de los extractos de *Camellia* frente a otras enfermedades que causan importantes pérdidas económicas en Galicia: *Gnomoniopsis smithogilvyi* L. A. Shuttleworth, E. C. Y. Liew y D. I. Guest y *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & Phillips.

Gnomoniopsis smithogilvyi (sinónimo de *Gnomoniopsis castaneae* Tamietti) es una especie emergente descrita como el agente causal de la pudrición del fruto del castaño (*Castanea sativa* Mill.) (Shuttleworth *et al.*, 2012; Visentin *et al.*, 2012). La enfermedad provocada por este patógeno se conoce como “podredumbre parda” y está originando daños en los frutos y erizos del castaño (**Fig. 9**) en los principales países productores europeos, reduciendo significativamente la producción de este cultivo y generando serias preocupaciones a los productores (Morales -Rodríguez *et al.*, 2022). En Galicia, el impacto económico de este cultivo tiene una gran importancia, ya que concentra el 66% de las plantaciones de España y produce el 90% de la producción total de castaña del país (MAPA, 2021).

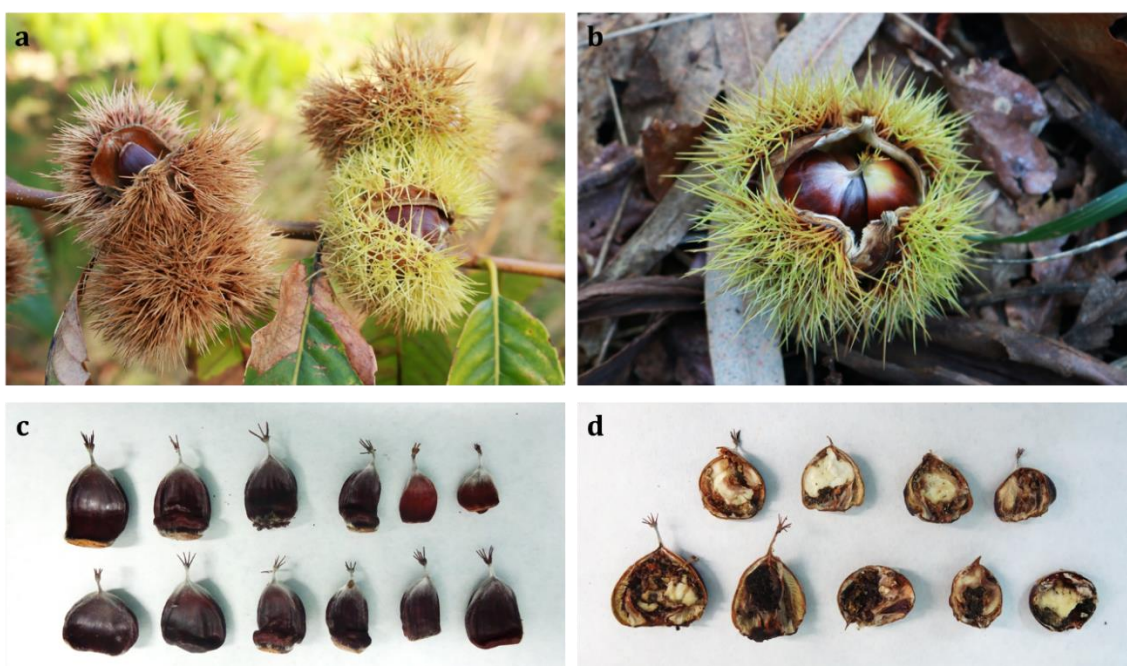


Fig. 9. Síntomas de la podredumbre parda causada por *G. smithogilvyi* en castaño: a) podredumbre y apertura prematura de los erizos; b) caída prematura de los erizos inmaduros; c) momificación de las castañas; d) diferentes niveles de podredumbre en las castañas.

La viticultura gallega proporciona vinos de excelente calidad, entre ellos varios registrados como Denominación de Origen Protegida, siendo un cultivo de gran relevancia económica en la región. En la actualidad, uno de los mayores problemas en la viticultura está causado por las enfermedades de madera (EMVs) (**Fig. 10**), un grupo destructivo de enfermedades fúngicas que afectan a la viña (*Vitis vinífera* L.) en todo el mundo (Redondo Fernández, 2019). En los últimos años en Galicia, se han realizado diversos muestreos que indican que los hongos de la familia Botryosphaeriaceae son los

que más están afectando a los viñedos gallegos, suponiendo la mitad del total de enfermedades detectadas (Pintos *et al.*, 2016, 2018). Dentro de la familia Botryosphaeriaceae, la especie que se detecta con más frecuencia en Galicia es *Neofusicoccum parvum*, una de las más virulentas de EMVs (Pintos *et al.*, 2012, 2018; Redondo Fernández, 2019). La virulencia de esta enfermedad y la falta de tratamientos efectivos han posicionado la investigación de alternativas eficaces y sostenibles como una de las líneas prioritarias.



Fig. 10. Síntomas asociados a las enfermedades de madera de viña (EMVs).

7. Ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad de control biológico del extracto frente a los patógenos seleccionados

Inicialmente, se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos de semillas de *Camellia* ricos en saponina recopilados en la **Tabla 2** y obtenidos mediante el proceso descrito en el apartado 4 y que se puede observar en la **Fig. 3**, frente a *Rhizoctonia solani*, *Gnomoniopsis smithogilyi*, *Pythium oligandrum* y *Fusarium oxysporum* a una concentración del 10% (w/v).

Para medir la actividad antifúngica *in vitro*, los diferentes extractos y un control (solo medio) se prepararon en frascos separados en PDA. Cada medio de cultivo se esterilizó en autoclave (121°C a 1 atm durante 20 min), se mezcló adecuadamente, se vertió en cajas de Petri esterilizadas y se dejó solidificar. En el centro de cada placa se colocó un disco de agar de 6 mm de diámetro del micelio en crecimiento activo de cada aislado fúngico. Se establecieron cinco placas para cada extracto y para cada patógeno y el control, repitiendo la prueba dos veces. Las placas se sellaron con Parafilm™ y se incubaron a 20°C en la oscuridad. La medición del crecimiento del micelio radial se registró después de una semana o hasta que los hongos crecieron demasiado.

La actividad inhibitoria de cada tratamiento se expresó como el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (IRG) utilizando la siguiente fórmula, donde RC = crecimiento radial del control y RT = crecimiento radial en las placas de agar tratadas (Chapagain *et al.*, 2007):

$$\text{IRG (\%)} = \left(\frac{\text{RC} - \text{RT}}{\text{RC}} \right) \times 100$$

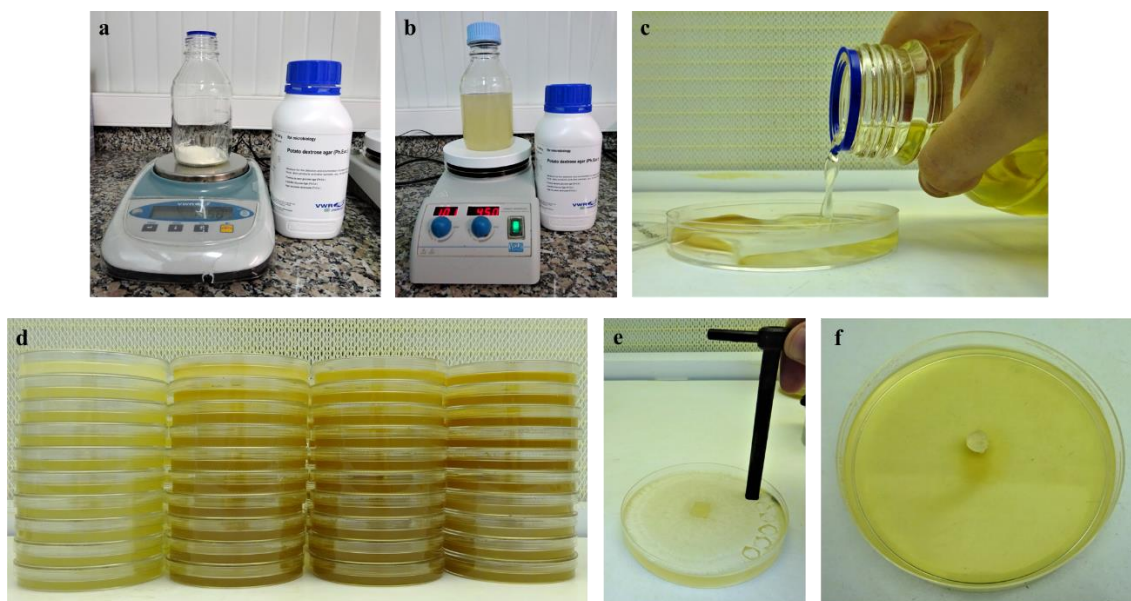


Fig. 11. Ensayos *in vitro* para evaluar la actividad antifúngica de los extractos de *Camellia*: a) pesaje de PDA y extractos según las concentraciones estudiadas; b) mezclado de PDA y extractos; c) vertido de los distintos medios en placas Petri esterilizadas; d) placas Petri control (solo PDA) y con distintos extractos de *Camellia*; e) repicado de los aislados fúngicos; f) disco de agar con el hongo correspondiente colocado en el centro de la placa Petri.

Los resultados obtenidos en este primer ensayo *in vitro* difieren entre los extractos de *Camellia* utilizados y los hongos estudiados. Se observa una reducción del crecimiento radial de todos los hongos, excepto de *Pythium* sp., aunque los resultados sólo son significativos en el caso de *Gnomoniopsis smithogilvyi*, hongo frente al cuál se alcanzaron tasas de inhibición del 100% (Tabla 6, Fig. 12).

Tabla 6. Promedio de inhibición del crecimiento radial de *Rhizoctonia solani*, *Gnomoniopsis smithogilvyi*, *Pythium oligandrum* y *Fusarium oxysporum* con los distintos tratamientos. En cada celda, se indica el SEM (error estándar de la media).

Patógeno	Inhibición del crecimiento radial (%)							
	Código del extracto ± SEM							
	23-21	22-20	28-21	32-21	21-20	24-21	25-21	26-21
<i>Rhizoctonia solani</i>	19.08 ± 10.71	13.37 ± 5.44	24.98 ± 1.86	6.66 ± 3.21	1.37 ± 0.25	12.24 ± 1.49	1.63 ± 0.13	13.20 ± 1.93
<i>Gnomoniopsis smithogilvyi</i>	93.90 ± 0.55	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	91.85 ± 0.61	100 ± 0	93.91 ± 0.53	100 ± 0
<i>Pythium</i> sp.	0.51 ± 0.38	0.43 ± 0.34	0.30 ± 0.30	0.79 ± 0.14	0.93 ± 0.34	1.03 ± 0.30	0.83 ± 0.30	0.71 ± 0.32
<i>Fusarium oxysporum</i>	7.78 ± 4.14	33.43 ± 2.56	32.13 ± 2.75	25.89 ± 2.30	24.12 ± 2.61	29.41 ± 1.88	22.93 ± 1.86	28.02 ± 3.35

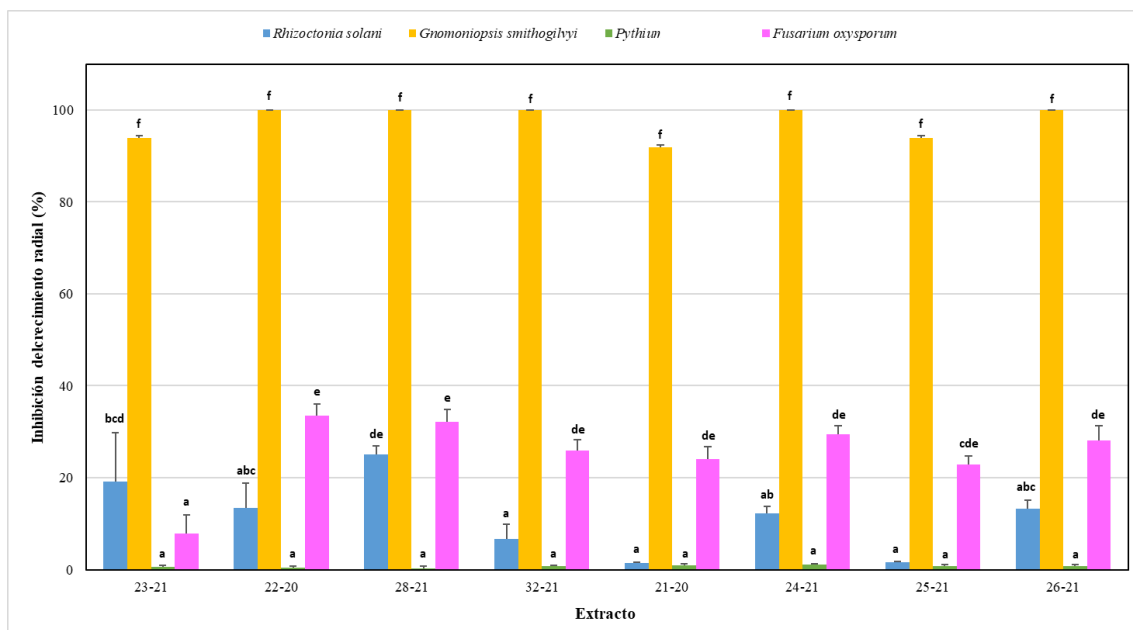


Fig. 12. Inhibición del crecimiento radial (%) de *Rhizoctonia solani*, *Gnomoniopsis smithogilvyi*, *Pythium oligandrum* y *Fusarium oxysporum* con los distintos tratamientos. Columnas con distinta letra indican porcentajes de inhibición significativamente diferentes para $p=0,05$. En cada columna, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

Dado el bajo rendimiento de los extractos obtenidos por este método, se prepararon adicionalmente más extractos a partir del residuo obtenido en el prensado en frío de semillas de *Camellia* con otro tipo de máquina, que genera residuos cilíndricos en lugar de “torta de prensado” o “torta de semillas”, y del residuo procedente de la decantación de los restos que quedan en la prensa. Al contrario que el procedimiento descrito anteriormente para la elaboración de extractos, estos residuos sólo fueron sometidos a un triturado y/o pulverizado, lo que maximiza el rendimiento del proceso.

Para los próximos ensayos *in vitro*, se seleccionó un extracto obtenido por cada uno de los dos métodos descritos previamente, siendo AC el extracto procedente de los residuos cilíndricos y DE el extracto originado a través de la decantación. Estos extractos se testaron *in vitro* a diferentes concentraciones (0.5, 1 y 3% (w/v)) contra patógenos que causan síntomas foliares (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum fioriniae*) y damping-off (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*), además de *Gnomoniopsis smithogilvyi* y *Neofusicoccum parvum*, por su relevancia en los sectores de la castañicultura y viticultura gallega.

En el experimento de *A. alternata*, los dos extractos mostraron una tasa de inhibición del crecimiento radial similar, alrededor del 60%, a las tres concentraciones estudiadas (0.5, 1 y 3% (w/v)), por lo que no hay diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Fig. 13, 14; Tabla 7). En este caso, los bioformulados de *Camellia* parecen una buena alternativa para reducir los niveles de este patógeno.

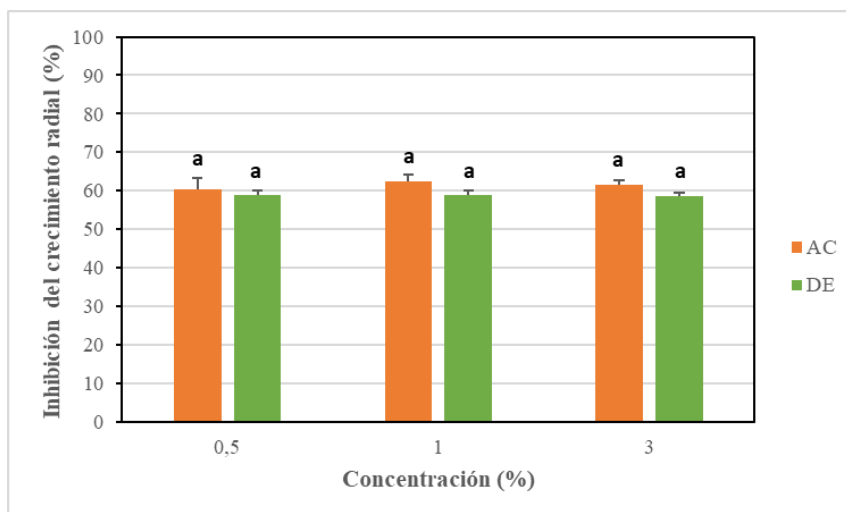


Fig. 13. Inhibición del crecimiento radial (%) de *Alternaria alternata* con los distintos tratamientos. Columnas con distinta letra indican porcentajes de inhibición significativamente diferentes para $p=0,05$. En cada columna, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

Tabla 7. Promedio de inhibición del crecimiento radial de *Alternaria alternata* con los distintos tratamientos. En cada celda, se indica el SEM (error estándar de la media).

Extracto Código	Inhibición del crecimiento radial (%)		
	Concentración (% w/v) $\pm$ SEM		
	0.50 %	1 %	3 %
AC	60.47 $\pm$ 2.67	62.40 $\pm$ 1.63	61.53 $\pm$ 1.11
DE	58.85 $\pm$ 1.27	58.96 $\pm$ 1.21	58.50 $\pm$ 1.06

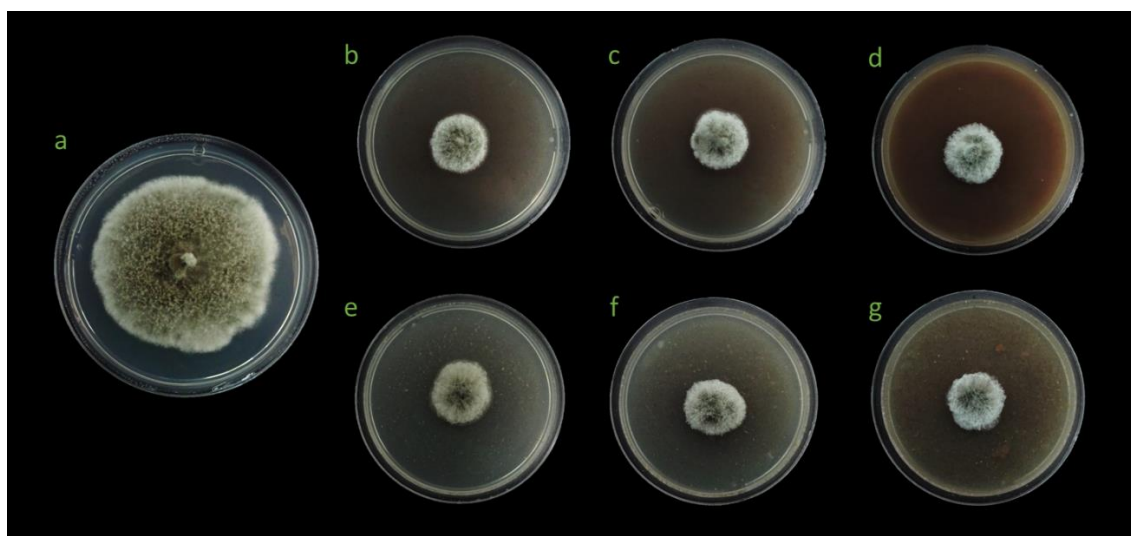


Fig. 14. Aspecto de los cultivos de *Alternaria alternata* a los 7 días de ensayo: *A. alternata* en PDA (a); *A. alternata* en PDA con extracto AC al 0,5% (b), 1% (c) y 3% (d); *A. alternata* en PDA con extracto DE al 0,5% (e), 1% (f) y 3% (g).

En el experimento con *B. cinerea*, el extracto AC mostró una inhibición significativamente mayor que el extracto DE, alcanzando valores de casi el 70% a la mayor concentración estudiada, por lo que los bioformulados de *Camellia* también

parecen una buena alternativa para reducir los niveles de este patógeno (Fig. 15, 16; Tabla 8).

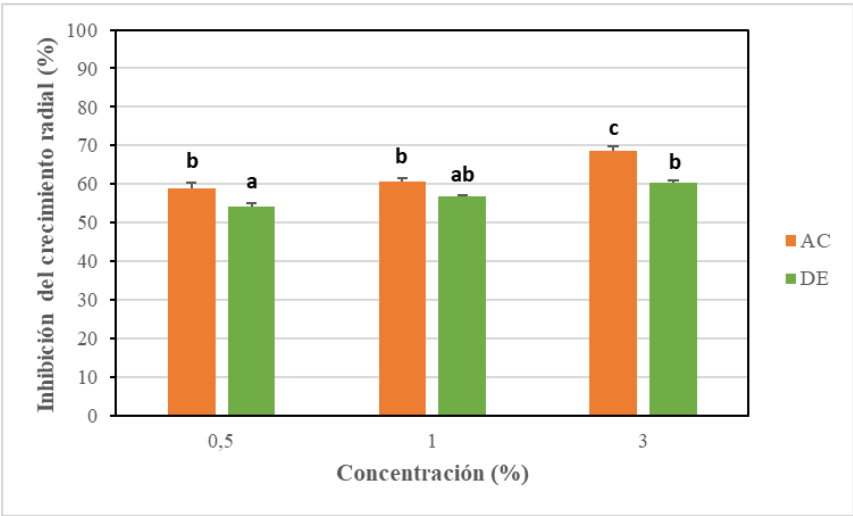


Fig. 15. Inhibición del crecimiento radial (%) de *Botrytis cinerea* con los distintos tratamientos. Columnas con distinta letra indican porcentajes de inhibición significativamente diferentes para $p=0,05$. En cada columna, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

Tabla 8. Promedio de inhibición del crecimiento radial de *Botrytis cinerea* con los distintos tratamientos. En cada celda, se indica el SEM (error estándar de la media).

Extracto Código	Inhibición del crecimiento radial (%)		
	Concentración (% w/v) $\pm$ SEM		
	0.50 %	1 %	3 %
AC	59.00 $\pm$ 1.48	60.59 $\pm$ 1.00	68.68 $\pm$ 1.06
DE	54.11 $\pm$ 0.85	56.72 $\pm$ 0.37	60.47 $\pm$ 0.31

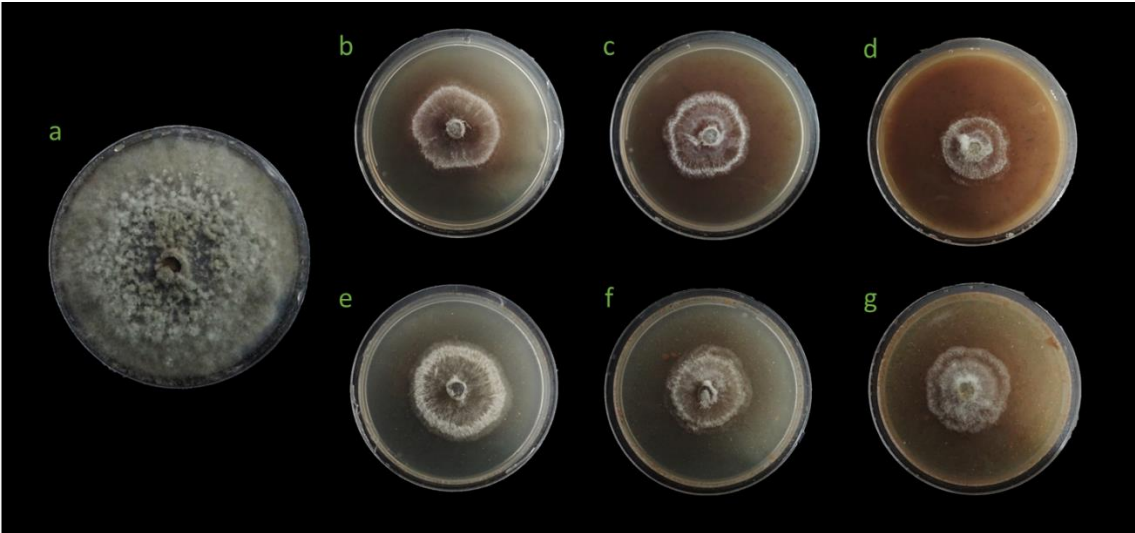


Fig. 16. Aspecto de los cultivos de *Botrytis cinerea* a los 6 días de ensayo: *B. cinerea* en PDA (a); *B. cinerea* en PDA con extracto AC al 0,5% (b), 1% (c) y 3% (d); *B. cinerea* en PDA con extracto DE al 0,5% (e), 1% (f) y 3% (g).

Respecto al último de los hongos que causa síntomas foliares evaluado, los extractos muestran una menor actividad fungicida frente a *C. fioriniae* que frente a *A. alternata* y

B. cinerea. No existen diferencias significativas entre los extractos, excepto a la concentración de 0.5% (w/v), aumentando la eficacia del bioformulado según aumenta la concentración aplicada (**Fig. 17, 18; Tabla 9**).

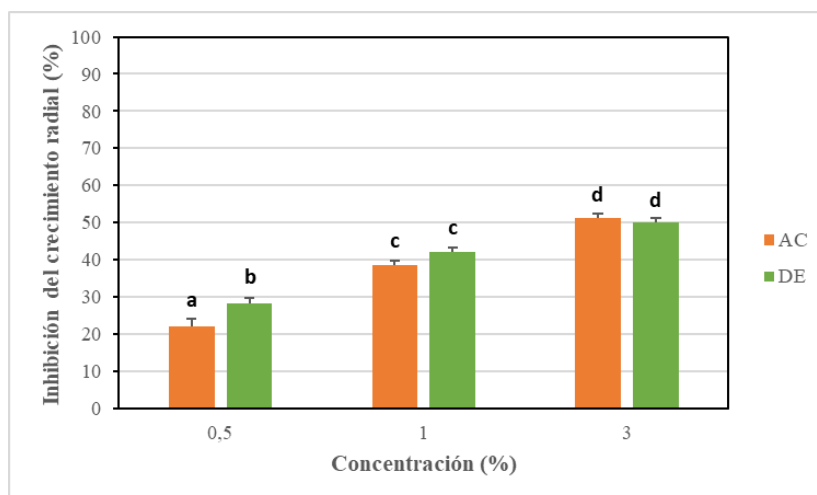


Fig. 17. Inhibición del crecimiento radial (%) de *Colletotrichum fioriniae* con los distintos tratamientos. Columnas con distinta letra indican porcentajes de inhibición significativamente diferentes para $p=0,05$. En cada columna, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

Tabla 9. Promedio de inhibición del crecimiento radial de *Colletotrichum fioriniae* con los distintos tratamientos. En cada celda, se indica el SEM (error estándar de la media).

Extracto Código	Inhibición del crecimiento radial (%)		
	Concentración (% w/v) $\pm$ SEM		
	0.50 %	1 %	3 %
AC	22.09 $\pm$ 1.86	38.41 $\pm$ 1.24	51.21 $\pm$ 1.06
DE	28.19 $\pm$ 1.49	42.11 $\pm$ 1.04	49.98 $\pm$ 1.17

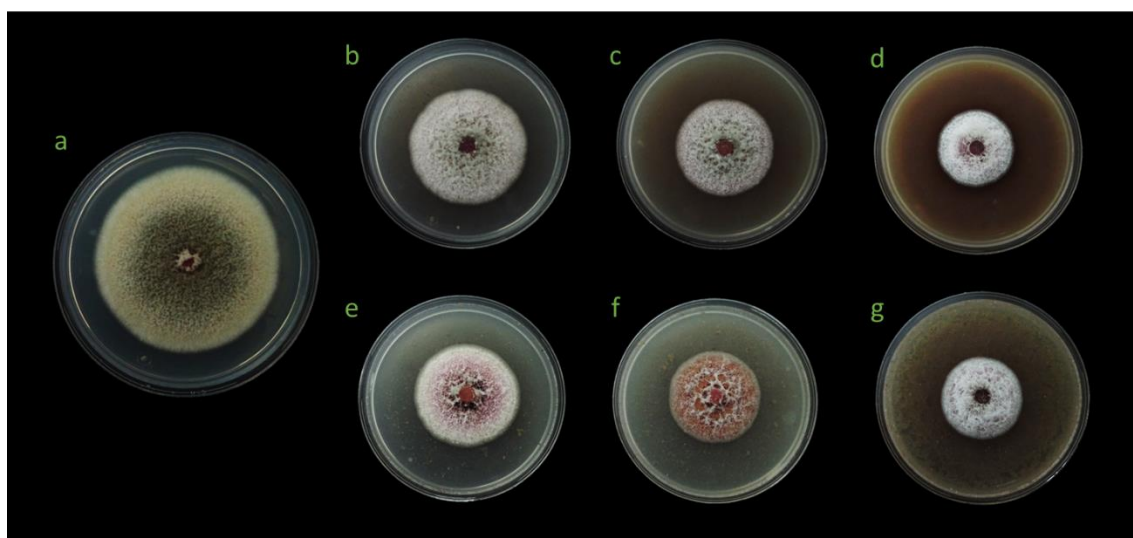


Fig. 18. Aspecto de los cultivos de *Colletotrichum fioriniae* a los 7 días de ensayo: *C. fioriniae* en PDA (a); *C. fioriniae* en PDA con extracto AC al 0,5% (b), 1% (c) y 3% (d); *C. fioriniae* en PDA con extracto DE al 0,5% (e), 1% (f) y 3% (g).

En el caso del damping-off, los bioformulados muestran una actividad fungicida reducida frente a *F. oxysporum*, difiriendo los resultados entre los distintos extractos y las distintas concentraciones, alcanzando apenas un 40% de inhibición (Fig. 19, 20; Tabla 10).

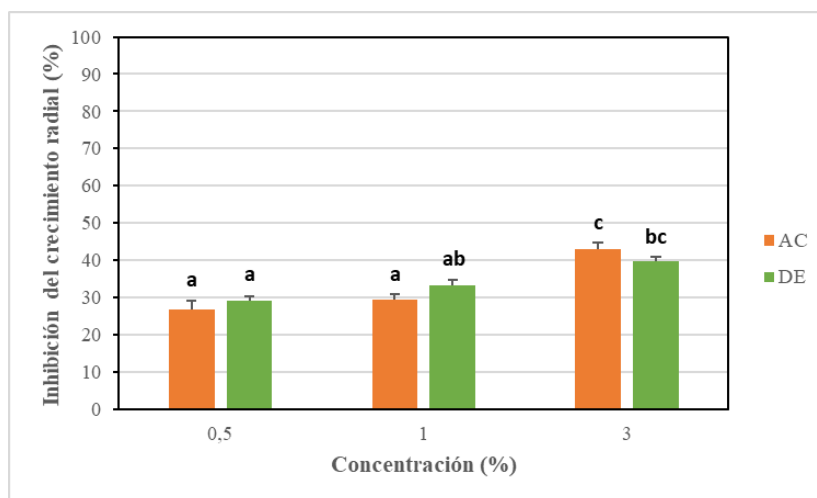


Fig. 19. Inhibición del crecimiento radial (%) de *Fusarium oxysporum* con los distintos tratamientos. Columnas con distinta letra indican porcentajes de inhibición significativamente diferentes para $p=0,05$. En cada columna, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

Tabla 10. Promedio de inhibición del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* con los distintos tratamientos. En cada celda, se indica el SEM (error estándar de la media).

Extracto	Inhibición del crecimiento radial (%)		
	Concentración (% w/v) ± SEM		
	0.50 %	1 %	3 %
Código			
AC	26.77 ± 2.39	29.32 ± 1.40	43.05 ± 1.52
DE	28.95 ± 1.29	33.10 ± 1.45	39.79 ± 1.15

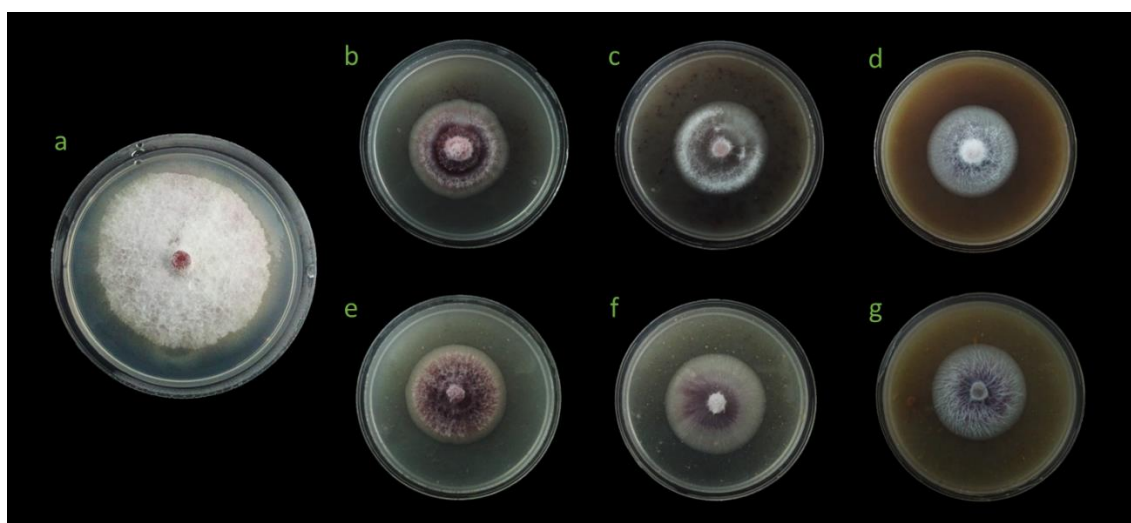


Fig. 20. Aspecto de los cultivos de *Fusarium oxysporum* a los 7 días de ensayo: *F. oxysporum* en PDA (a); *F. oxysporum* en PDA con extracto AC al 0,5% (b), 1% (c) y 3% (d); *F. oxysporum* en PDA con extracto DE al 0,5% (e), 1% (f) y 3% (g).

Sin embargo, los bioformulados muestran una gran actividad fungicida frente a *R. solani*, produciendo el extracto DE la mayor inhibición a todas las concentraciones estudiadas (**Fig. 21, 22; Tabla 11**). La eficacia de los extractos frente a este patógeno oscila entre el 64-77%, unos valores elevados que indican la posibilidad de utilizar estos productos como un tratamiento alternativo y sostenible.

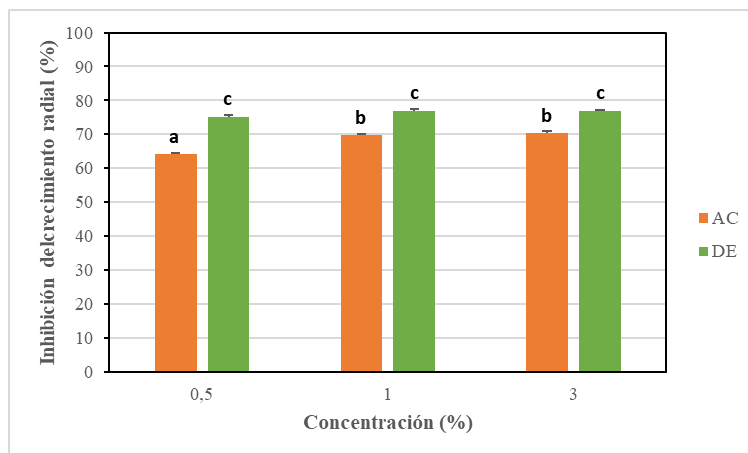


Fig. 21. Inhibición del crecimiento radial (%) de *Rhizoctonia solani* con los distintos tratamientos. Columnas con distinta letra indican porcentajes de inhibición significativamente diferentes para $p=0,05$. En cada columna, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

Tabla 11. Promedio de inhibición del crecimiento radial de *Rhizoctonia solani* con los distintos tratamientos. En cada celda, se indica el SEM (error estándar de la media).

Extracto Código	Inhibición del crecimiento radial (%)		
	Concentración (% w/v) ± SEM		
	0.50 %	1 %	3 %
AC	64.14 ± 0.33	69.78 ± 0.39	70.43 ± 0.44
DE	74.99 ± 0.72	76.92 ± 0.56	76.97 ± 0.32

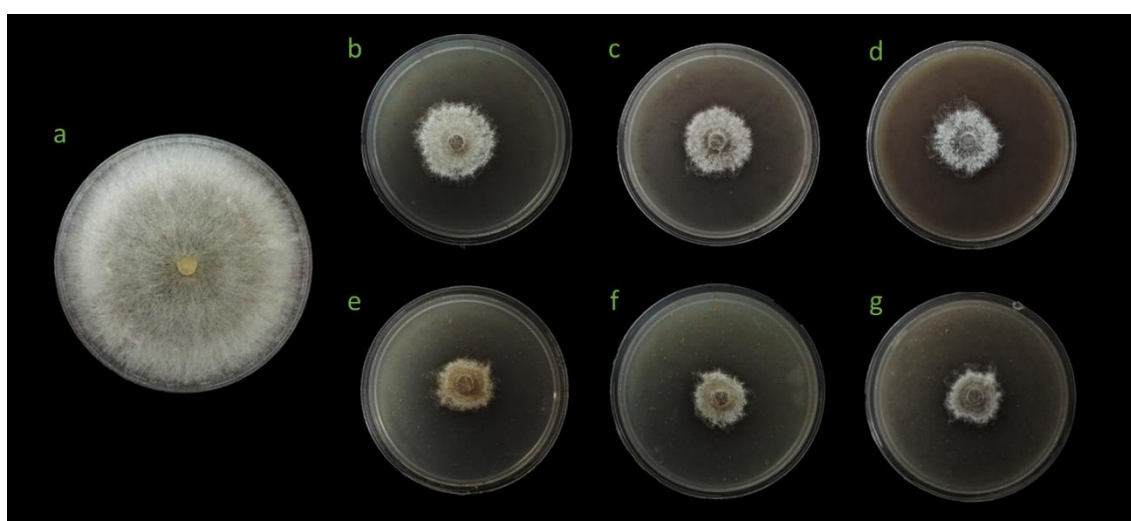


Fig. 22. Aspecto de los cultivos de *Rhizoctonia solani* a los 3 días de ensayo: *R. solani* en PDA (a); *R. solani* en PDA con extracto AC al 0,5% (b), 1% (c) y 3% (d); *R. solani* en PDA con extracto DE al 0,5% (e), 1% (f) y 3% (g).

Dada la eficacia de los extractos frente a *Gnomoniopsis smithogilvyi* en el experimento preliminar, se repitieron los ensayos con uno de los extractos iniciales que mostraron una inhibición del 100% (CJ) y los extractos AC y DE. Existen diferencias significativas entre los tres extractos y las tres concentraciones estudiadas, siendo CJ el menos eficaz a las concentraciones más bajas, lo que sumado al bajo rendimiento del proceso para su obtención, reafirma nuestra decisión de seleccionar los extractos AC y DE para desarrollar bioproductos eficaces frente a diferentes patógenos, aprovechando un residuo para crear un tratamiento alternativo y sostenible que pueda ser utilizado en los cultivos. Los extractos AC y DE presentan una inhibición del 100% a la concentración del 3%, por lo que puede ser interesante evaluar su efectividad en planta, dada la elevada incidencia de *G. smithogilvyi* en los sotos gallegos (Fig. 23, 24; Tabla 12).

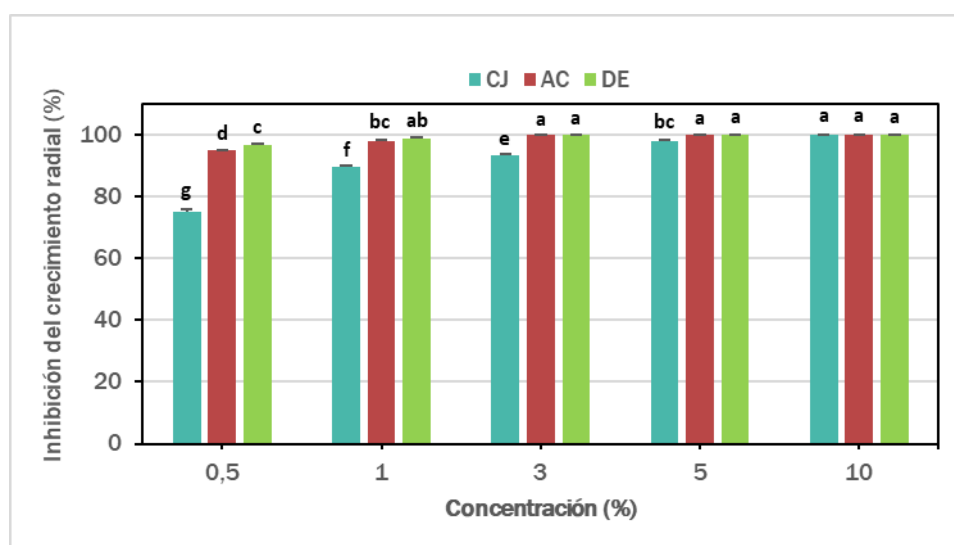


Fig. 23. Inhibición del crecimiento radial (%) de *Gnomoniopsis smithogilvyi* con los distintos tratamientos. Columnas con distinta letra indican porcentajes de inhibición significativamente diferentes para $p=0,05$. En cada columna, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

Tabla 12. Promedio de inhibición del crecimiento radial de *Gnomoniopsis smithogilvyi* con los distintos tratamientos. En cada celda, se indica el SEM (error estándar de la media).

Extracto Código	Inhibición del crecimiento radial (%)				
	Concentración (% w/v) ± SEM				
	0.50 %	1 %	3 %	5%	10%
CJ	75.06 ± 0.71	89.50 ± 0.39	93.47 ± 0.46	97.88 ± 0.50	100 ± 0
AC	95.03 ± 0.25	97.99 ± 0.39	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
DE	96.93 ± 0.42	98.94 ± 0.16	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0

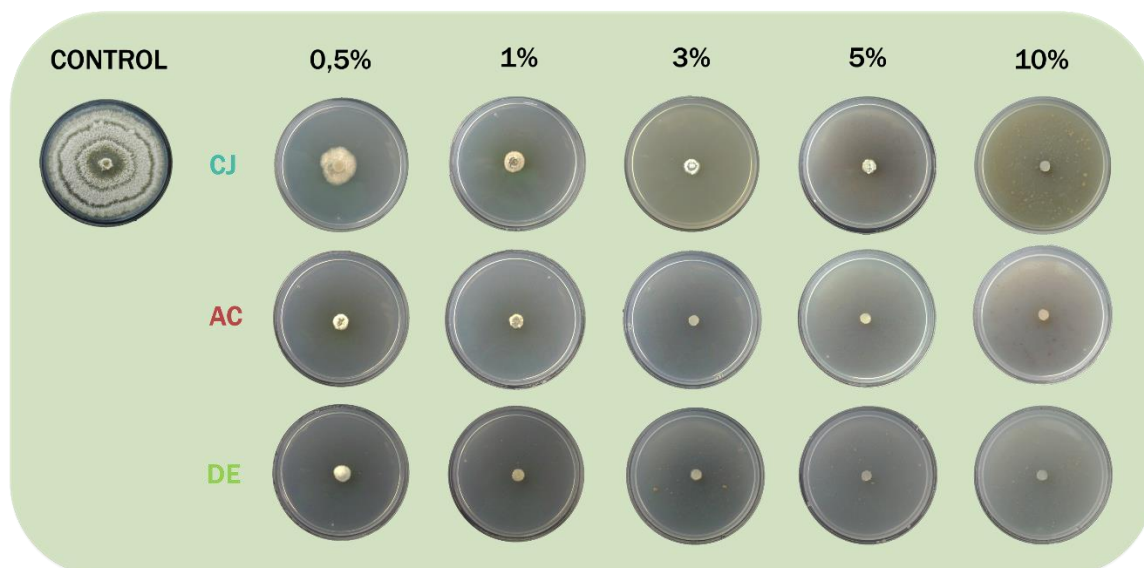


Fig. 24. Aspecto de los cultivos de *Gnomoniopsis smithogilvyi* a los 7 días del ensayo de tres residuos (CJ, AC y DE) a diferentes concentraciones (0.5-10%).

Por último, se evaluaron los extractos frente a *N. parvum*, patógeno que mostró los peores resultados de inhibición de todos los estudiados, llegando a penas a un 15%, lo que indica la baja eficacia frente a esta enfermedad (Fig. 25, 26; Tabla 13).

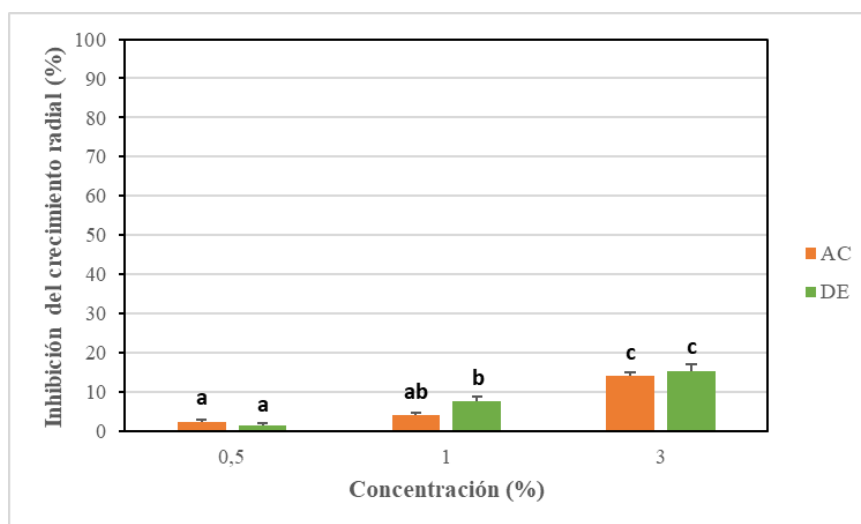


Fig. 25. Inhibición del crecimiento radial (%) de *Neofusicoccum parvum* con los distintos tratamientos. Columnas con distinta letra indican porcentajes de inhibición significativamente diferentes para $p=0,05$. En cada columna, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

Tabla 13. Promedio de inhibición del crecimiento radial de *Neofusicoccum parvum* con los distintos tratamientos. En cada celda, se indica el SEM (error estándar de la media).

Extracto	Inhibición del crecimiento radial (%)		
	Concentración (% w/v) $\pm$ SEM		
	0.50 %	1 %	3 %
Código			
AC	2.34 $\pm$ 0.48	3.95 $\pm$ 0.58	13.94 $\pm$ 1.04
DE	1.40 $\pm$ 0.48	7.54 $\pm$ 1.17	15.27 $\pm$ 1.69

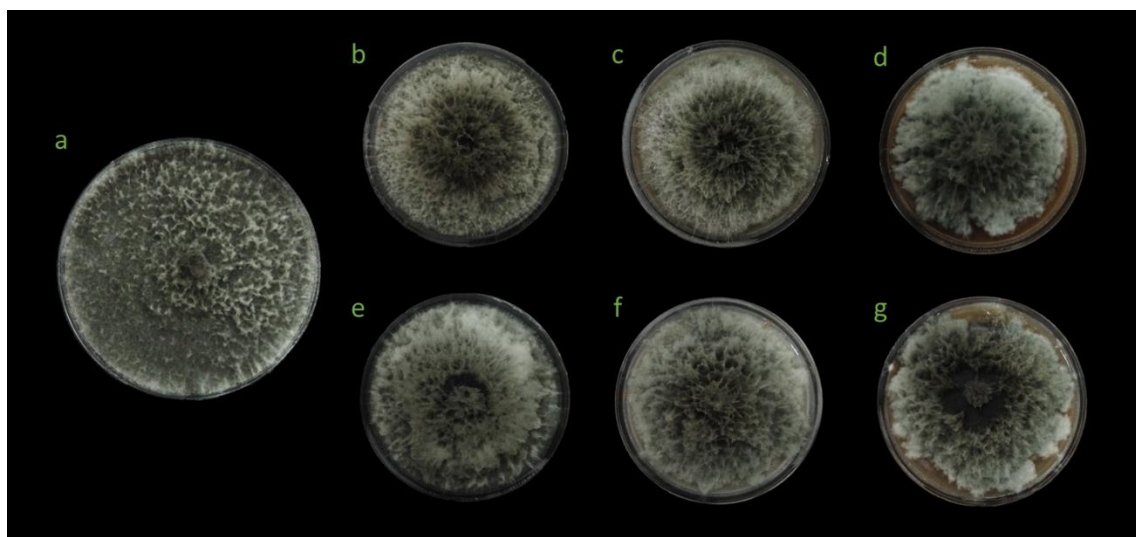


Fig. 26. Aspecto de los cultivos de *Neofusicoccum parvum* a los 7 días de ensayo: *N. parvum* en PDA (a); *N. parvum* en PDA con extracto AC al 0,5% (b), 1% (c) y 3% (d); *N. parvum* en PDA con extracto DE al 0,5% (e), 1% (f) y 3% (g).

8. Estudio de las plagas más relevantes en viveros

Durante el desarrollo del proyecto, se monitorizaron y muestrearon las parcelas de Galiplant Ornamental S.L. para detectar las plagas con mayor incidencia en los cultivos.

La principal plaga detectada, tanto en aromáticas como en ornamentales, fue el pulgón, apareciendo distintas especies de la familia Aphididae en diferentes cultivos del vivero (**Fig. 27**). Los pulgones causan deformación y marchitamiento de hojas, además de la reducción del crecimiento de la planta y la aparición de negrilla por la melaza que secretan (Blackman & Eastop, 2000; Simon & Peccoud, 2018). La negrilla que crece sobre esta melaza puede afectar a la fotosíntesis de la planta, además de a su aspecto estético, fundamental en cultivos ornamentales (Guerrieri & Digilio, 2008).

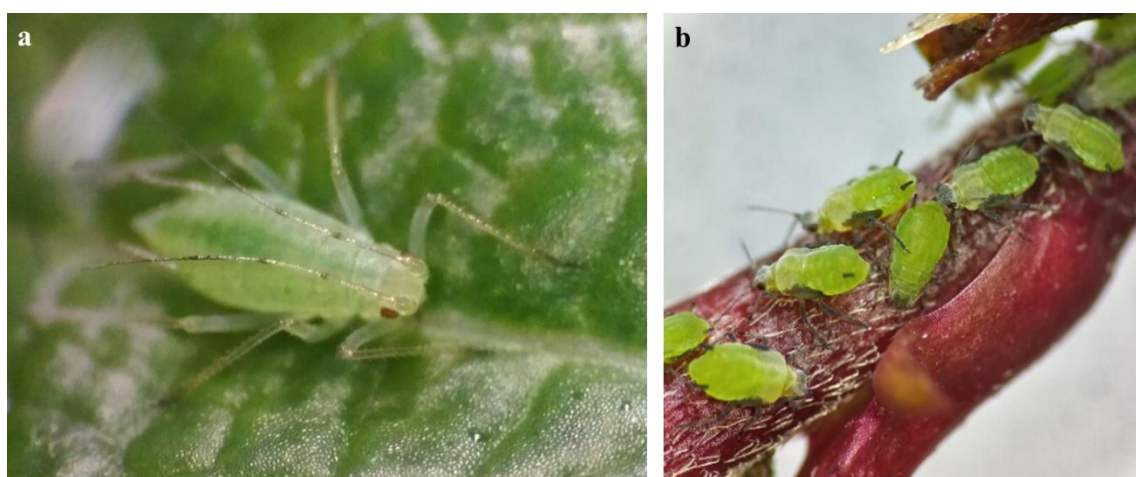


Fig. 27. Diferentes especies de áfidos detectados en varios cultivos de Galiplant Ornamental S.L.

También se identificaron ejemplares de cochinilla algodonosa (*Planococcus citri*), insectos que se alimentan de las partes aéreas de la planta, dificultando el crecimiento y provocando deformaciones o amarillamiento de las hojas, causando defoliación y disminución de la fotosíntesis. Además, la secreción blanca y cerosa que producen las cochinillas disminuye considerablemente el valor ornamental de las plantas afectadas (Polat *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2006). Adicionalmente, se detectaron individuos de araña roja (*Tetranychus urticae* Koch), que provoca decoloración y desecación en las hojas, mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius), un insecto temido por su alta resistencia a diversos insecticidas y su tendencia a transmitir virus, y diversas especies de nematodos (Fig. 28).



Fig. 28. Diferentes especies plaga detectadas en varios cultivos de Galiplant Ornamental S.L.: a) cochinilla algodonosa en *Nandina*; b) araña roja; c) nematodo.

9. Ensayos para evaluar el potencial bioinsecticida del extracto

Para medir la actividad insecticida *in vitro*, se introdujeron 20 ejemplares de pulgón verde, con brotes de los que alimentarse, en placas Petri y se aplicó sobre ellos un control (solo agua) o el extracto CJ a diferentes concentraciones (8 y 10% (w/v)), repitiendo el experimento dos veces. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente y se monitorizaron diariamente, registrando los datos de mortalidad cada 24 horas.

La actividad insecticida de cada tratamiento se expresó como la mortalidad corregida (CM) utilizando la siguiente fórmula, donde n.i. = número de insectos y Co = control (Abbott, 1925):

$$CM (\%) = \left(\frac{\text{n.i. muertos después del tratamiento} - \text{n.i. muertos en el Co}}{100 - \text{n.i. muertos en el Co}} \right) \times 100$$

El extracto estudiado mostró una eficacia mayor a la concentración más elevada, incrementando el número de pulgones muertos a la vez que aumentaba el tiempo del experimento. Cabe destacar que, inicialmente, el potencial insecticida del extracto no fue muy elevado (36-38%), aunque su eficacia incrementó considerablemente con el tiempo hasta alcanzar valores de casi el 70% (Fig. 29).

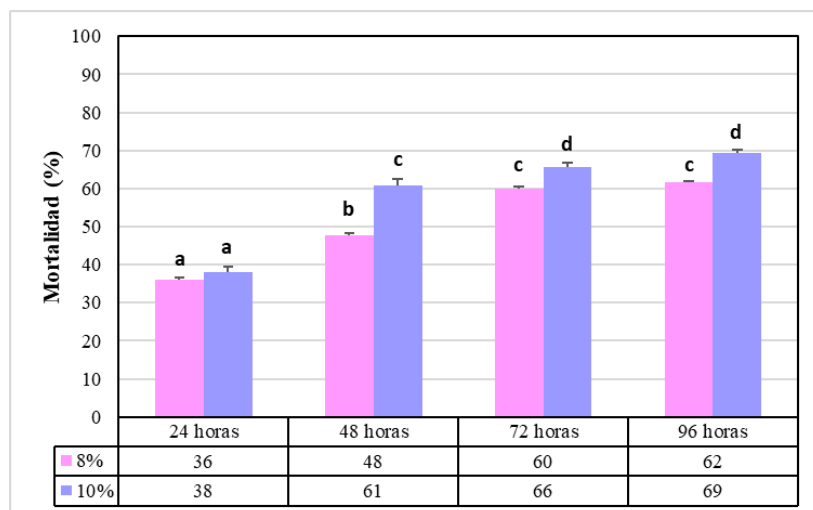


Fig. 29. Mortalidad (%) de pulgón verde con el extracto CJ a distinta concentración (8 y 10% (w/v)). Columnas con distinta letra indican porcentajes de inhibición significativamente diferentes para $p=0,05$. En cada columna, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

Para evaluar la actividad insecticida *in vivo*, se seleccionaron plantas de *Nandina domestica* Thunb. infestadas de pulgón, ya que durante la realización del proyecto sufrieron un ataque considerable de la plaga (**Fig 30 a-b**). Estas plantas fueron cultivadas en macetas de 5L y mantenidas por Galiplant Ornamental S.L. Se seleccionaron un total de 1000 plantas, de las cuáles 500 se utilizaron como control, aplicándoles sólo agua, y el resto fueron tratadas con el extracto de *Camellia* al 10%, que mostró los mejores resultados en las pruebas *in vitro* (**Fig. 30 c-d**).



Fig. 30. Ensayo *in vivo* para evaluar la actividad bioinsecticida del extracto de *Camellia*: a-b) plantas de *Nandina* infestadas de pulgón; b) lote de plantas de *Nandina* seleccionadas para el experimento; c) planta de *Nandina* tratada con extracto de *Camellia*.

Dada la dificultad de contabilizar los individuos de pulgón vivos y muertos en cada una de las plantas individualmente, éstas se monitorizaron semanalmente, registrando los datos de presencia o ausencia de plaga. Se observó una reducción temporal en la cantidad de pulgón en las plantas tratadas con extracto de *Camellia*, confirmando los datos obtenidos en los ensayos *in vitro*, pero, al no tener una eficacia del 100%, los ejemplares de pulgón supervivientes continuaban reproduciéndose y volviendo a los mismos niveles que en las plantas control si se dejaba de aplicar el tratamiento.

Aunque se observaron diferentes niveles de bioactividad, los resultados obtenidos sugieren que habría que testar otros extractos de residuos de *Camellia* para comprobar si su eficacia es mayor de la obtenida en este experimento, ya que, al interrumpir el tratamiento, los pulgones supervivientes se reproducían y la plaga volvía a los niveles iniciales.

10. Ensayos *in vivo* para evaluar el potencial bioestimulante del extracto

Para realizar el ensayo en planta con el extracto de *Camellia* y comprobar la influencia de este tratamiento sobre el crecimiento de las plantas seleccionadas (*Lavandula angustifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Cyathea cooperi* y *Vinca minor*), se llevaron a cabo dos experimentos independientes con 20 plantas cada uno (10 plantas cada tratamiento) en laboratorio. Adicionalmente, se realizó un experimento en el vivero, seleccionando un total de 1000 plantas, de las cuales 500 se utilizaron como control, aplicándoles sólo agua, y el resto fueron tratadas con el extracto de *Camellia* al 0.5%. La decisión de aplicar el extracto al 0.5% fue tomada, fundamentalmente, porque se observó una buena actividad biofungicida a bajas dosis (al contrario que en el caso de los insectos) en los experimentos realizados. Además, la aplicación de una dosificación baja, permite aumentar el rendimiento de los residuos, consiguiendo preparar más producto con menos gasto de extracto de *Camellia*.

Las plantas de lavanda, romero y *Vinca* se plantaron en macetas de 2L y las de *Cyathea* en macetas de 5L. Una vez trasplantadas las plantas, se midió su altura y el número de ramas o frondes, en el caso de *Cyathea cooperi*, para tener unos datos iniciales con los que comparar el progreso del experimento, y se aplicaron los distintos tratamientos (Control y Extracto AC al 0.5%). En cada planta se aplicaron 10 ml mediante pulverización y se tomaron medidas de altura, número de ramas o frondes y número de flores, desde el inicio del experimento hasta el final, a intervalos de 7 días. Una vez terminado el ensayo, se arrancaron las plantas, se lavaron las raíces y se pesaron para obtener datos de peso fresco y seco.

Las plantas de lavanda no mostraron diferencias significativas respecto al crecimiento en altura entre los dos tratamientos (**Fig. 31**), pero sí que experimentaron un notable aumento del número de ramas al tratarlas con el bioformulado de *Camellia* (**Fig. 32**).

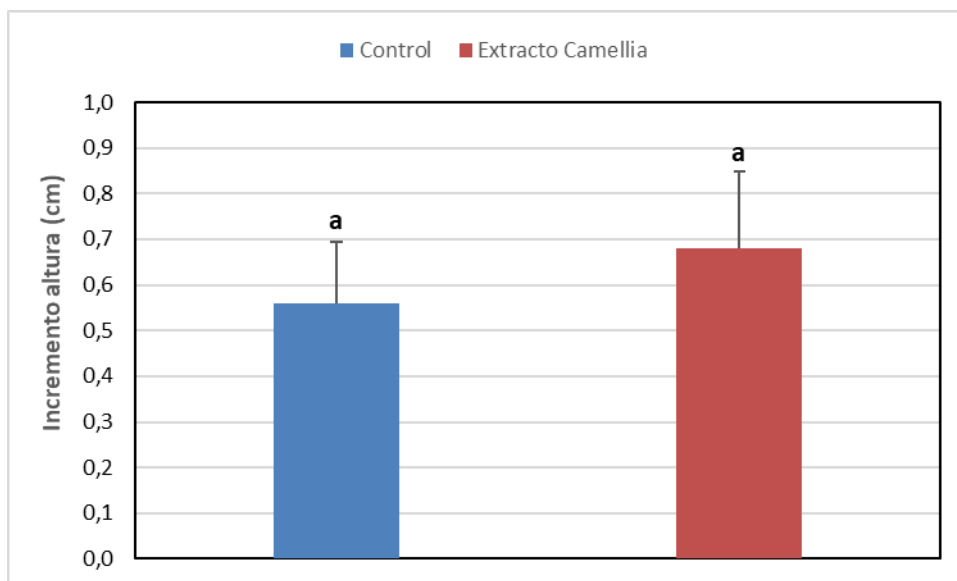


Fig. 31. Incremento de altura (cm) de las plantas de lavanda control (azul) y tratadas con extracto de *Camellia* (rojo). Columnas con distinta letra indican incrementos de altura significativamente diferentes para $p=0,05$. En cada columna, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

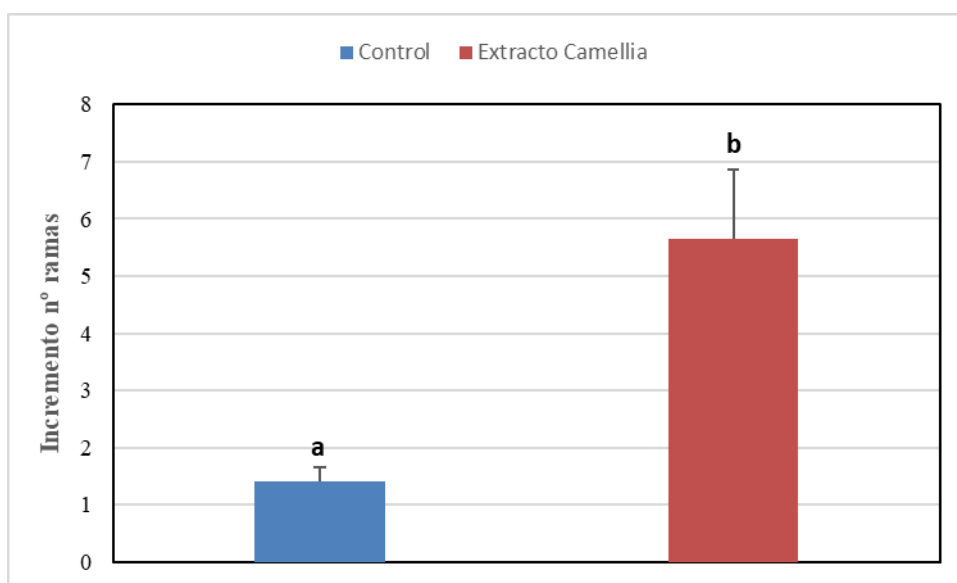


Fig. 32. Incremento del número de ramas de las plantas de lavanda control (azul) y tratadas con extracto de *Camellia* (rojo). Columnas con distinta letra indican incrementos de altura significativamente diferentes para $p=0,05$. En cada columna, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

Por otro lado, las plantas de lavanda sufrieron un severo ataque de *Botrytis cinerea* durante la realización de los trabajos (**Fig. 33**). En este caso, no se consiguió curar completamente la enfermedad, pero sí que se frenó su avance en las plantas en las que se aplicó el extracto de *Camellia*. Esto se relaciona con el experimento *in vitro* realizado anteriormente, el que observamos que el residuo de *Camellia* inhibía parcialmente el crecimiento radial del hongo, aunque no conseguía combatirlo al 100% (**Fig. 15, 16; Tabla 8**).



Fig. 33. Plantas de lavanda infectadas por *Botrytis cinerea*.

En el caso de la otra aromática evaluada, se produjo un efecto similar al ocurrido en lavanda. Las plantas de romero no experimentaron diferencias significativas en el crecimiento en altura entre los dos tratamientos (**Fig. 34, 35**), pero sí incrementaron significativamente el número de ramas en las plantas tratadas con el bioformulado de *Camellia* (**Fig. 36, 37, 38**).

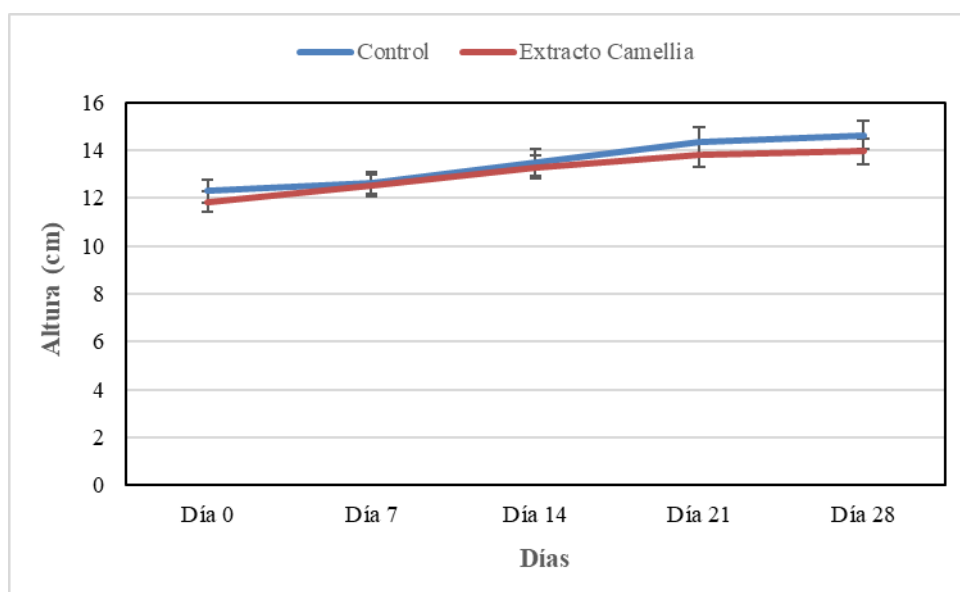


Fig. 34. Evolución de la altura (cm) de las plantas de romero control (azul) y tratadas con extracto de *Camellia* (rojo) durante los 28 días de experimento. En cada punto, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

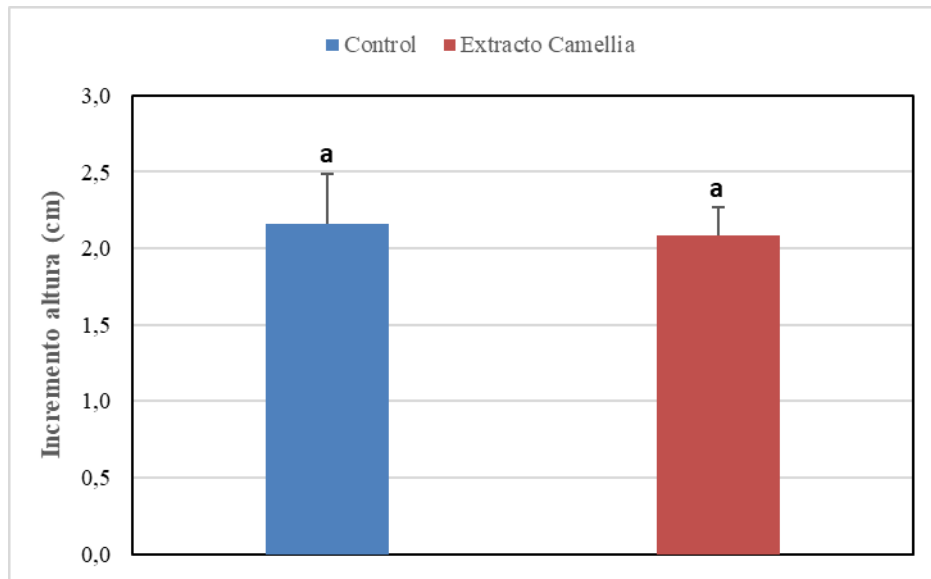


Fig. 35. Incremento de altura (cm) de las plantas de romero control (azul) y tratadas con extracto de *Camellia* (rojo). Columnas con distinta letra indican incrementos de altura significativamente diferentes para $p=0,05$. En cada columna, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

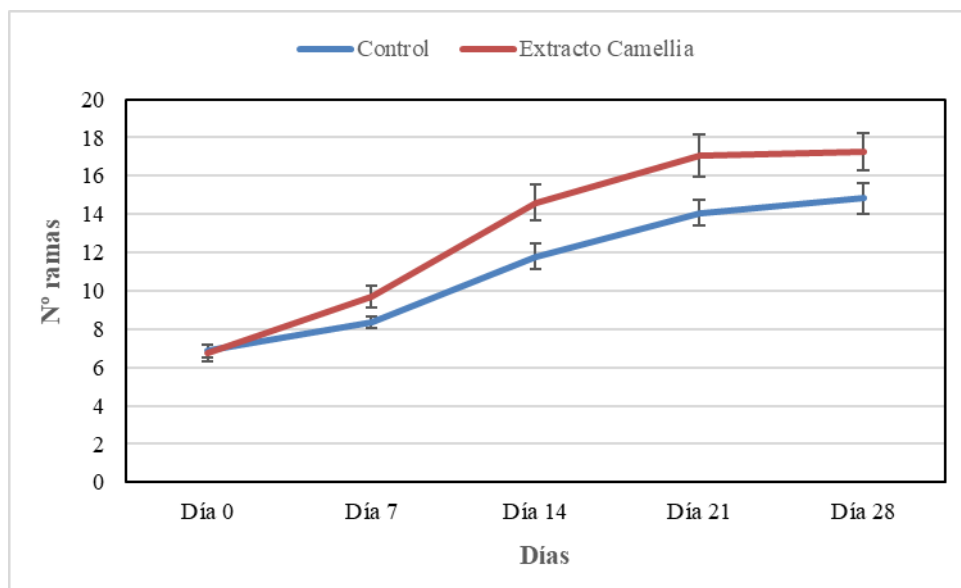


Fig. 36. Evolución del número de ramas de las plantas de romero control (azul) y tratadas con extracto de *Camellia* (rojo) durante los 28 días de experimento. En cada punto, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

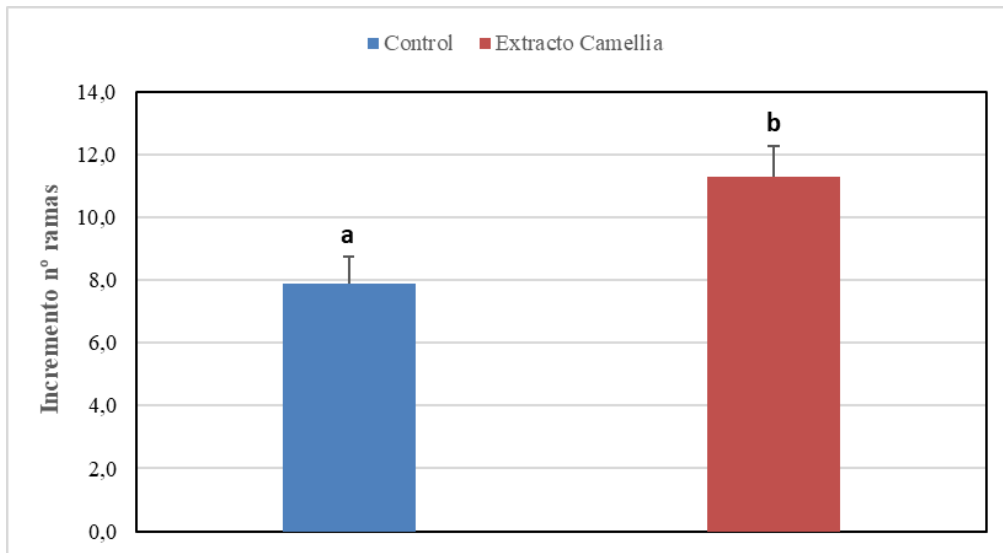


Fig. 37. Incremento del número de ramas de las plantas de romero control (azul) y tratadas con extracto de *Camellia* (rojo). Columnas con distinta letra indican incrementos de altura significativamente diferentes para $p=0,05$. En cada columna, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

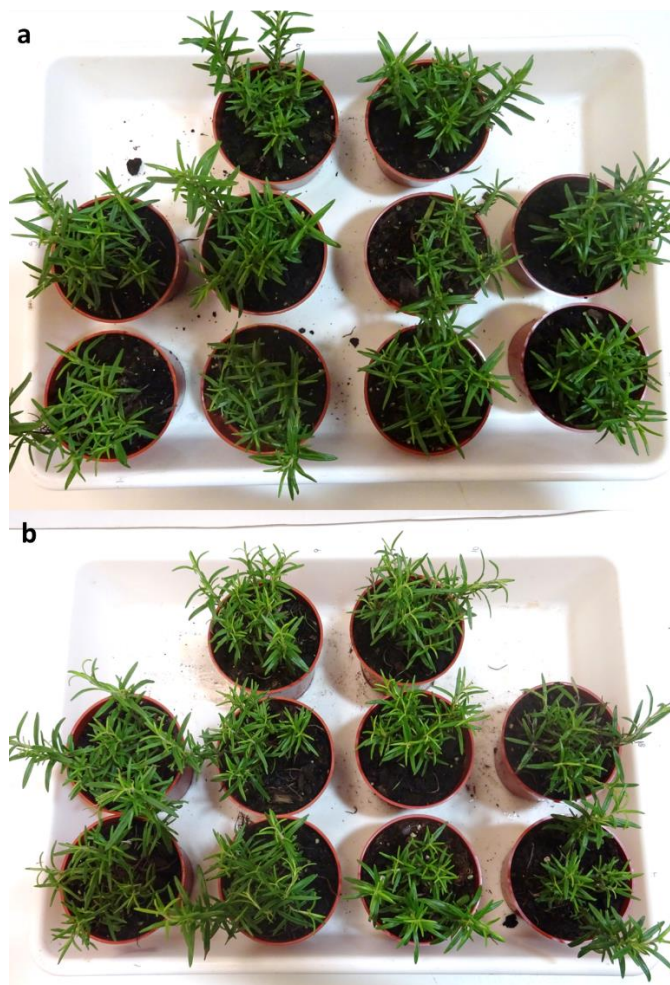


Fig. 38. Plantas de romero con: a) control; b) extracto de *Camellia*. En las plantas tratadas con *Camellia* se puede observar una mayor ramificación.

En cuanto a los cultivos ornamentales, el helecho arborescente *Cyathea cooperi* no mostró diferencias significativas ni en altura (**Fig. 39, 40**) ni en número de frondes (**Fig. 41, 42**) entre los dos tratamientos aplicados.

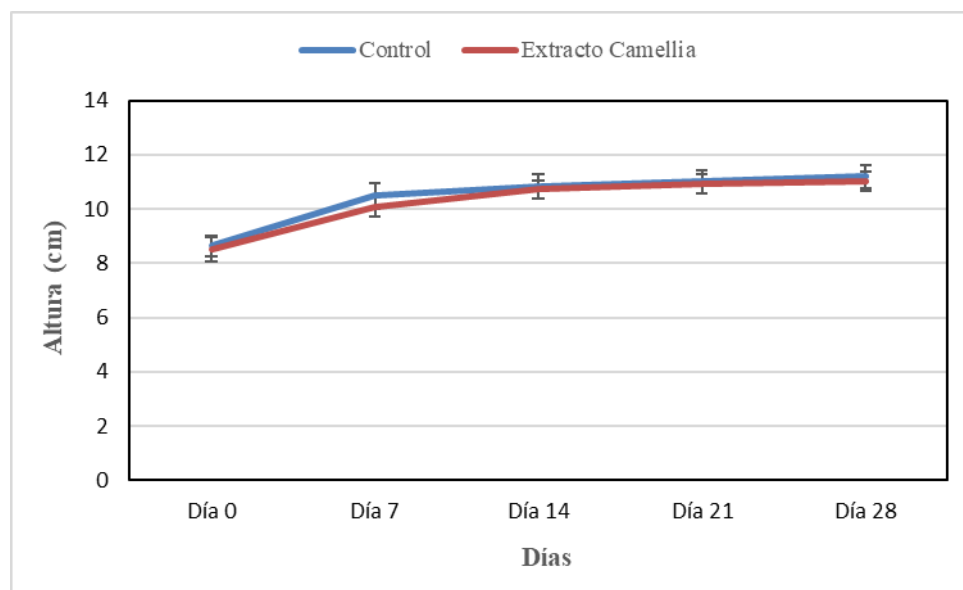


Fig. 39. Evolución de la altura (cm) de las plantas de *Cyathea* control (azul) y tratadas con extracto de *Camellia* (rojo) durante los 28 días de experimento. En cada punto, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

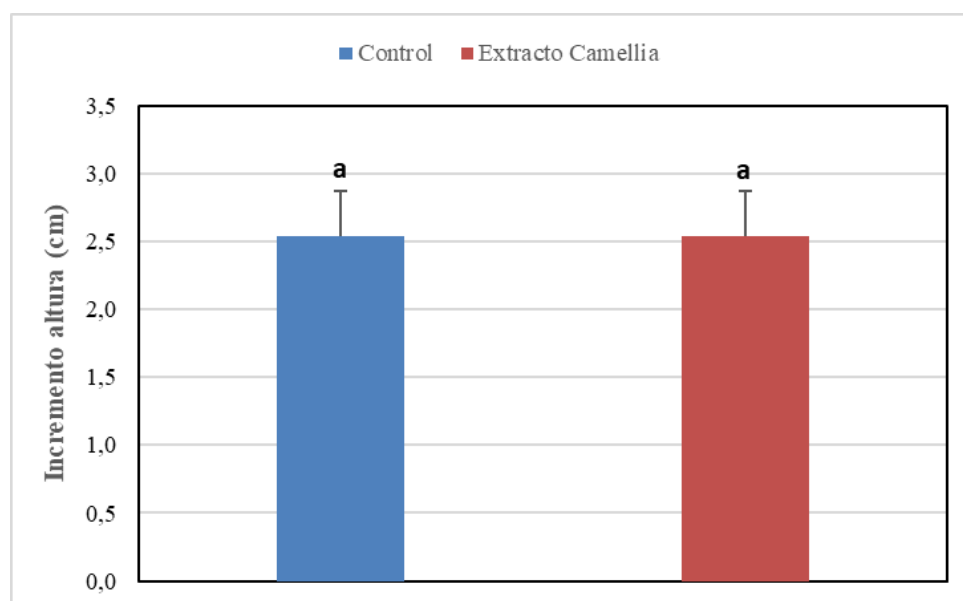


Fig. 40. Incremento de altura (cm) de las plantas de *Cyathea* control (azul) y tratadas con extracto de *Camellia* (rojo). Columnas con distinta letra indican incrementos de altura significativamente diferentes para $p=0,05$. En cada columna, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

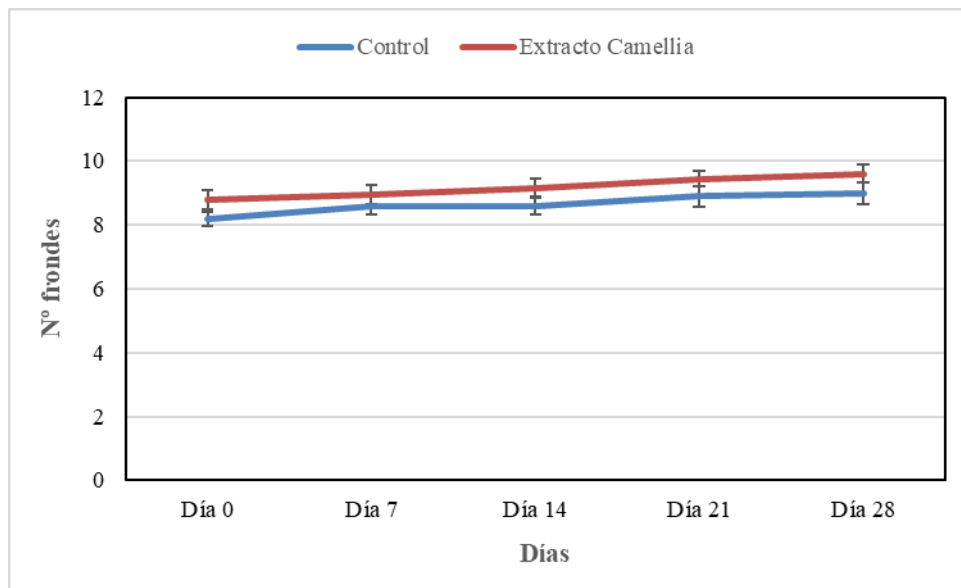


Fig. 41. Evolución del número de frondes de las plantas de *Cyathea* control (azul) y tratadas con extracto de *Camellia* (rojo) durante los 28 días de experimento. En cada punto, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

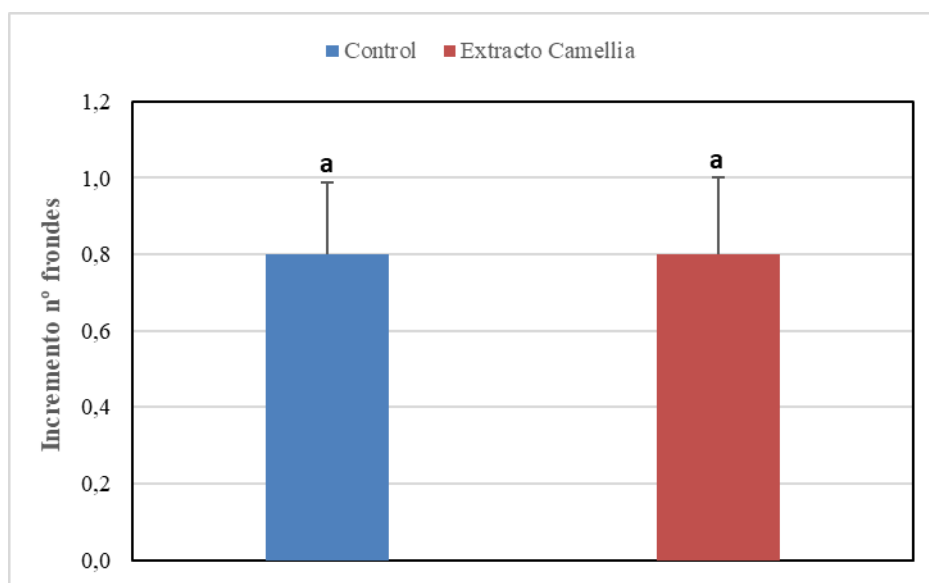


Fig. 42. Incremento del número de frondes de las plantas de *Cyathea* control (azul) y tratadas con extracto de *Camellia* (rojo). Columnas con distinta letra indican incrementos de altura significativamente diferentes para $p=0,05$. En cada columna, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

Por último, en el caso de la *Vinca*, no se midió la altura al ser una planta de porte tapizante, pero sí se obtuvieron diferencias significativas en la ramificación, siendo mayor en las plantas tratadas con *Camellia* que en las plantas control (Fig. 43, 44, 45).

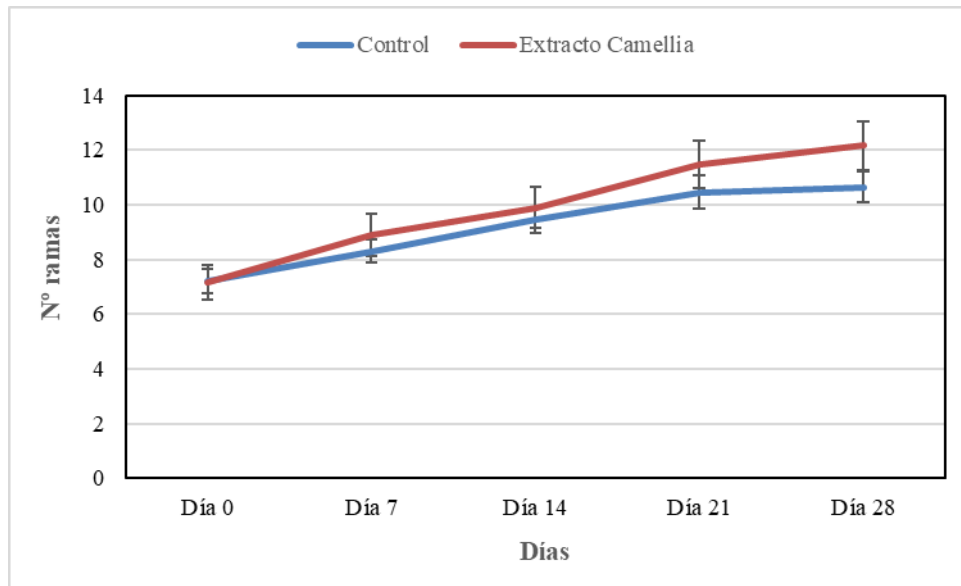


Fig. 43. Evolución del número de ramas de las plantas de *Vinca* control (azul) y tratadas con extracto de *Camellia* (rojo) durante los 28 días de experimento. En cada punto, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

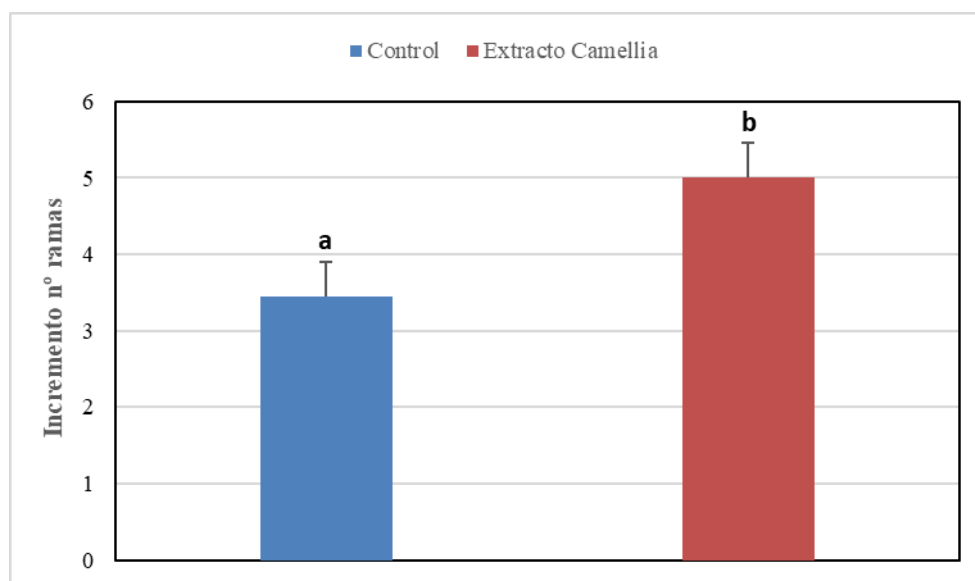


Fig. 44. Incremento del número de ramas de las plantas de *Vinca* control (azul) y tratadas con extracto de *Camellia* (rojo). Columnas con distinta letra indican incrementos de altura significativamente diferentes para $p=0,05$. En cada columna, la barra representa el SEM (error estándar de la media).

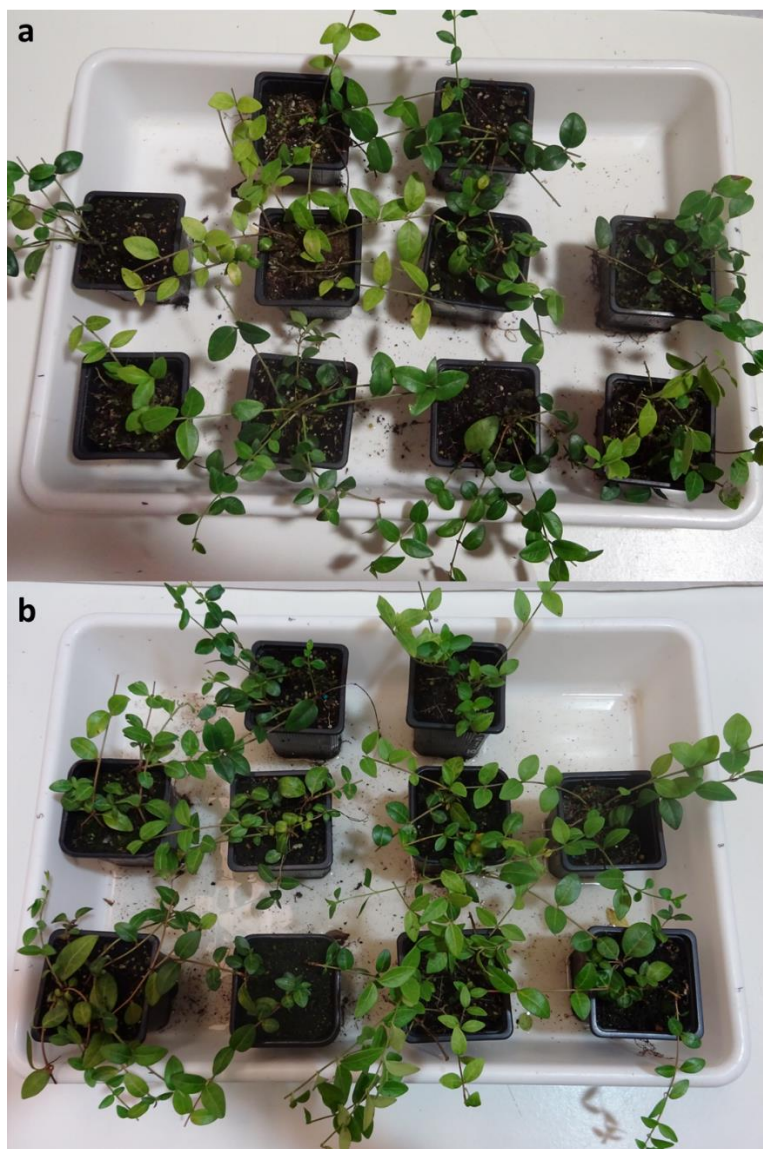


Fig. 45. Plantas de *Vinca* con: a) control; b) extracto de *Camellia*. En las plantas tratadas con *Camellia* se puede observar una mayor ramificación.

En ninguno de los cultivos estudiados se observó una estimulación de la floración ni diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados respecto al peso fresco y seco de las plantas.

11. Divulgación de los resultados

La empresa Galiplant Ornamental S.L., socia de la Asociación de Viveristas del Noroeste (Asvinor), la Asociación de Cultivos do Baixo Miño (Acubam) y la comercializadora Coplant Galicia; Fauna Útil S.L., socia de la Asociación de Cultivos do Baixo Miño (Acubam), la Plataforma Tecnológica de Biotecnología Vegetal BioVegen, la Sociedad Española de la Camelia (SEC) y la Fundación IN&FIAR, de la que es miembro fundador; y la Estación Fitopatológica Areeiro, socia y colaboradora de numerosas entidades, tanto públicas como privadas, se hicieron eco del presente proyecto tanto en sus respectivas páginas web como en el resto de sus redes, consiguiendo una gran difusión de los resultados.

Todos los implicados en el proyecto (Galiplant Ornamental S.L., Fauna Útil S.L. y Estación Fitopatológica Areeiro) divulgaron los resultados en los distintos eventos que organizaron o a los que asistieron como participantes. Por otro lado, Fauna Útil S.L. incluyó el proyecto en un folleto informativo sobre la empresa, que fue distribuido en todos los eventos en los que participó la institución durante el desarrollo del trabajo. A continuación, se listan todos los eventos:

- 8º Congreso Forestal Español, que tuvo lugar entre el 27 de junio y el 1 de julio de 2022 en Lleida.
- X Congreso de Mejora Genética de Plantas, que tuvo lugar entre el 19 y el 22 de septiembre de 2022 en Pontevedra.
- Jornadas técnico-científicas de Biocastanea, XVIII Feria Internacional de la Castañicultura, que tuvo lugar entre el 17 y el 20 de octubre de 2022 en el Campus Universitario de Ponferrada.
- XX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, que tuvo lugar entre el 24 y el 26 de octubre de 2022 en Valencia.
- Iberflora 2022, que tuvo lugar entre el 4 y el 6 de octubre de 2022 en Valencia.
- Evento Galicia Avanza – Programa de Aceleración para a Internacionalización de Pemes, que tuvo lugar el 15 de febrero de 2023 en el Parque Tecnológico de Galicia, Tecnópole.
- ABANCA CIMAG-GANDAGRO IV Feria profesional de maquinaria, agricultura y ganadería, que tuvo lugar entre los días 2 y 4 de marzo de 2023 en la Feria Internacional de Galicia ABANCA en Silleda.
- International Camellia Society Congress 2023, que tuvo lugar entre el 26 y el 28 de marzo de 2023 en Italia.
- Taller de Sostenibilidad y Cultivos Ecológicos, donde la empresa Fauna Útil participó dando una charla formativa, el 26 de abril de 2023 en el Centro de Interpretación Terras do Miño en Lugo.
- XVIII Feira de Cultivos do Baixo Miño, que tuvo lugar entre los días 12 y 14 de mayo de 2023 en Goián (Tomiño).
- VII International Chestnut Symposium, que tuvo lugar entre el 26 y el 29 de junio de 2023 en la Escuela Politécnica Superior de Lugo.



Fig. 46. Stands de Fauna Útil S.L. en: a) ABANCA CIMAG-GANDAGRO IV Feria profesional de maquinaria, agricultura y ganadería; b) XVIII Feira de Cultivos do Baixo Miño.

Adicionalmente, se prepararon dos trabajos con parte de los resultados del proyecto, que fueron presentados en el XX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, entre el 24 y 26 de octubre de 2022 en Valencia, y el International Camellia Society Congress 2023, entre el 26 y 28 de marzo de 2023 en Italia. Ambas publicaciones pueden consultarse en el Anexo II. Actividades de divulgación de los resultados del presente documento.

El primer trabajo titulado “Efecto de tres residuos obtenidos en el proceso de extracción de aceite de *Camellia* spp. frente a *Gnomoniopsis smithogilvyi*” fue presentado en formato póster durante el XX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología y actualmente puede consultarse en la Revista Fitopatología nº7 de 2022, la publicación oficial de la Sociedad Española de Fitopatología, que está disponible en su página web (<https://sef.es/congresos>).

El segundo trabajo titulado “Antifungal activity of several *Camellia* oil extraction residues against plant pathogens” fue presentado en formato póster durante el International Camellia Society Congress 2023 y actualmente puede consultarse en el libro “Proceedings of International Camellia Society Congress 2023 in Italy”, disponible en la página web de la Sociedad (<https://internationalcamellia.org/en-us/articles/congresses-and-meetings/ics-congress-2023>).

12. Conclusiones y perspectivas futuras

El método utilizado en este trabajo permite obtener extractos ricos en saponinas aprovechando los residuos generados en la producción de aceite de semillas de *Camellia* para desarrollar un bioproducto con propiedades fungicidas y bioestimulantes, sin utilizar ninguna sustancia perjudicial para el medio ambiente, recuperando un residuo y posibilitando su aprovechamiento. El uso de este tipo de bioproductos desarrollados a partir de extractos de plantas parece ser una alternativa prometedora para reducir la aplicación de fitosanitarios nocivos por su alta efectividad e inocuidad para el medio ambiente.

Se observaron diferentes niveles de bioactividad, pero los resultados obtenidos sugieren que los residuos de *Camellia* tienen un impacto relevante como fungicida sobre distintos patógenos causantes de grandes pérdidas en viveros como *Alternaria alternata* o *Rhizoctonia solani*, además de una eficacia del 100% *in vitro* sobre *Gnomoniopsis smithogilvyi*, el hongo causante de la pudrición de las castañas que está ocasionando graves pérdidas en el sector gallego y en los principales países productores.

Por otro lado, se comprobó el potencial bioestimulante del extracto, ya que tres de los cultivos estudiados (lavanda, romero y *Vinca*) mostraron un aumento de la ramificación, lo que coincide con diferentes investigaciones que demostraron los efectos fisiológicos de las saponinas en la regulación del crecimiento vegetal (Faizal & Geelen, 2013; Supradip *et al.*, 2010).

Aunque deben realizarse más estudios complementarios para comprobar la eficacia del bioformulado en otros cultivos y conseguir su registro, la incorporación de este nuevo producto biológico especializado para los nuevos retos agrícolas actúa como elemento tractor para la incorporación de tecnólogos al sector y, en general, de personal más cualificado, además de contribuir a la creación y fijación de empleo en el rural,

realimentando el desarrollo del mismo y contribuyendo al desarrollo económico y social de Galicia.

13. Referencias bibliográficas

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265-267.
- Akihisa, T., Tokuda, H., Ukiya, M., Suzuki, T., Enjo, F., Koike, K., Nikaido, T. and Nishino, H. (2004). 3-Epicabraleahydroxylactone and other triterpenoids from *Camellia* oil and their inhibitory effects on Epstein–Barr virus activation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(1), 153-156.
- Akihisa, T., Yasukawa, K., Kimura, Y., Yamanouchi, S., and Tamura, T. (1998). Sasanquol, a 3, 4-seco-triterpene alcohol from sasanqua oil, and its anti-inflammatory effect. *Phytochemistry*, 48(2), 301-305.
- Apers, S., Baronikova, S., Sindambiwe, J. B., Witvrouw, M., De Clercq, E., Berghe, D. V., Marck, E.V., Vlietinck, A. and Pieters, L. (2001). Antiviral, haemolytic and molluscicidal activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*: establishment of structure-activity relationships. *Planta medica*, 67(6), 528-532.
- Blackman, R. L., and Eastop, V. F. (2000). Aphids on the world's crops: an identification and information guide No. Ed. 2. John Wiley & Sons Ltd.
- Carbone, I., and Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556.
- Chapagain, B. P., Wiesman, Z., and Tsrer, L. (2007). *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 26(2), 109-115.
- Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Risède, J. M., Simoneau, P., and Hywel-Jones, N. L. (2004). *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Studies in Mycology*, 50, 415-430.
- Demirbas, A. (2010). Tea seed upgrading facilities and economic assessment of biodiesel production from tea seed oil. *Energy Conversion and Management*, 51(12), 2595-2599.
- Feás, X., Estevinho, L. M., Salinero, C., Vela, P., Sainz, M. J., Vázquez-Tato, M. P., and Seijas, J. A. (2013). Triacylglyceride, antioxidant and antimicrobial features of virgin *Camellia oleifera*, *C. reticulata* and *C. sasanqua* oils. *Molecules*, 18(4), 4573-4587.
- Faizal, A., & Geelen, D. (2013). Saponins and their role in biological processes in plants. *Phytochemistry Reviews*, 12, 877-893.
- Feng, M., Zhu, Z., Zuo, L., Chen, L., Yuan, Q., Shan, G., and Luo, S. Z. (2015). A strategy for rapid structural characterization of saponins and flavonoids from the testa of *Camellia oleifera* Abel seeds by ultra-high-pressure liquid chromatography combined with electrospray ionization linear ion trap-orbitrap mass spectrometry. *Analytical Methods*, 7(14), 5942-5953.
- Gardes, M., and Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113-118.
- Geiser, D. M., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A. and O'Donnell, K. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 473-479.
- Glass, N. L., and Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1323-1330.
- Guerrieri, E., and Digilio, M. C. (2008). Aphid-plant interactions: a review. *Journal of Plant Interactions*, 3(4), 223-232.

- Guo, N., Tong, T., Ren, N., Tu, Y., and Li, B. (2018). Saponins from seeds of Genus *Camellia*: phytochemistry and bioactivity. *Phytochemistry*, 149: 42-55.
- Jin, X. (2012). Bioactivities of water-soluble polysaccharides from fruit shell of *Camellia oleifera* Abel: Antitumor and antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 2198-2201.
- Kelley, W. D., and Oak, S. W. (1989). Damping-off. Forest Nursery Pests. USDA Forest Service, Agricultural Handbook, n° 680, p. 184.
- Kuo, P. C., Lin, T. C., Yang, C. W., Lin, C. L., Chen, G. F., and Huang, J. W. (2010). Bioactive saponin from tea seed pomace with inhibitory effects against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8618-8622.
- Lamichhane, J. R., Dürr, C., Schwanck, A. A., Robin, M. H., Sarthou, J. P., Cellier, V., Messéan, A., and Aubertot, J. N. (2017). Integrated management of damping-off diseases. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37, 1-25.
- Lee, C. P., and Yen, G. C. (2006). Antioxidant activity and bioactive compounds of tea seed (*Camellia oleifera* Abel.) oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 779-784.
- Li, X., Deng, J., Shen, S., Li, T., Yuan, M., Yang, R., and Ding, C. (2015). Antioxidant activities and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from defatted *Camellia oleifera* seed cake. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 5681-5690.
- Li, M., Haiyan, Z., and Yongzhong, C. (2012). Study on tea saponin extraction from shell of oil-tea *Camellia* seeds. In *1st International Conference on Mechanical Engineering and Material Science* (MEMS 2012) (pp. 267-272). Atlantic Press.
- Liang, H., Hao, B. Q., Chen, G. C., Ye, H., and Ma, J. (2017). *Camellia* as an oilseed crop. *HortScience*, 52(4): 488-497.
- Liau, B. C., Ponnusamy, V. K., Lee, M. R., Jong, T. T., and Chen, J. H. (2017). Development of pressurized hot water extraction for five flavonoid glycosides from defatted *Camellia oleifera* seeds (byproducts). *Industrial Crops and Products*, 95, 296-304.
- Lin, C. Y., and Fan, C. L. (2011). Fuel properties of biodiesel produced from *Camellia oleifera* Abel oil through supercritical-methanol transesterification. *Fuel*, 90(6), 2240-2244.
- Lockwood, J. L. (1986). Soilborne plant pathogens: Concepts and connections. *Phytopathology*, 76(1), 20-27.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (2021). Anuario de estadística: Superficies y producciones de cultivos. Available at: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2021/default.aspx>, last accessed May 2023.
- Meng, X., Li, J., Bi, F., Zhu, L., and Ma, Z. (2015). Antifungal activities of crude extractum from *Camellia semiserrata* Chi (Nanshancha) seed cake against *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium italicum* in vitro and in vivo fruit test. *The Plant Pathology Journal*, 31(4), 414.
- Morales-Rodriguez, C., Bastianelli, G., Caccia, R., Bedini, G., Massantini, R., Moschetti, R., Thomidis, T., and Vannini, A. (2022). Impact of ‘brown rot’ caused by *Gnomoniopsis castanea* on chestnut fruits during the post-harvest process: critical phases and proposed solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(2), 680-687.
- Namita, P., Mukesh, R., and Vijay, K. J. (2012). *Camellia sinensis* (green tea): a review. *Global Journal of Pharmacology*, 6(2): 52-59.
- O'Donnell, K., and Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(1), 103-116.

- Odufuwa K.T., Atunnise A., Kinnah H.J., Adeniji P.O., and Salau B.A. (2013). Changes in saponins content of some selected nigerian vegetables during blanching and juicing. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 3:34-42.
- Panth, M., Hassler, S. C., and Baysal-Gurel, F. (2020). Methods for management of soilborne diseases in crop production. *Agriculture*, 10(1), 16.
- Park, J. S., Rho, H. S., Kim, D. H., and Chang, I. S. (2006). Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 2951-2956.
- Pintos, C., Redondo, V., Costas, D., Aguin, O., & Mansilla, P. (2018). Fungi associated with grapevine trunk diseases in nursery-produced *Vitis vinifera* plants. *Phytopathologia Mediterranea*, 57(3), 407-424.
- Pintos, C., Redondo, V. y Mansilla, J. P. (2016). Situación actual de las enfermedades de madera de vid en planta adulta. Campo Galego. Disponible en: <http://www.campogalego.com/es/vina-es/situacion-actual-de-las-enfermedades-de-madera-de-vid-en-planta-adulta/>
- Polat, F., Ulgenturk, S., and Kaydan, M. B. (2008). Developmental biology of citrus mealybug, *Planococcus citri* (Risso) (Hemiptera: Pseudococcidae), on ornamental plants. In *Proceedings of the International Symposium on Scale Insect Studies*, 11, 177-184.
- Proguard Inc. (1997). Utilización de saponina para el control de patógenos. ES, Patente No. 2145943T3. Oficina Española de Patentes y Marcas, 04.06.1997.
- Rao, C. N., Shivankar, V. J., and Singh, S. (2006). Citrus mealy bug (*Planococcus citri* Risso) management- a review. *Agricultural Reviews*, 27(2), 142-146.
- Redondo Fernández, V. (2019). Enfermedades de madera de viña: identificación, patogenicidad y control biológico de los hongos causantes del decaimiento por *Botryosphaeria*. Doctoral dissertation, Programa de Doutoramento en Biotecnología Avanzada (RD 99/2011).
- Rodríguez, A. T., Morales, D., and Ramírez, M. A. (2000). Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de hongos fitopatógenos. *Cultivos Tropicales*, 21(2), 79-82.
- Salinero, M. C., Pintos, C., Redondo, V., Abelleira, A., Vela, P., Barreiro, R., and Aguin, O. (2020). Effect of *Camellia* oil extraction residue as a biocontrol agent against plant pathogens. In *Proceedings of International Camellia Society Congress 2020* in Goto, Japan.
- Simon, J. C., and Peccoud, J. (2018). Rapid evolution of aphid pests in agricultural environments. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 17-24.
- Shuttleworth, L.A., Liew, E.C.Y., and Guest, D.I. (2012) *Gnomoniopsis smithogilvyi* sp. nov. fungal plant description sheets 107–127. *Persoonia* 28, 142– 143.
- Sparg, S., Light, M. E., and Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2-3): 219-243.
- Supradip, S., Suresh, W., Jitendra, K., & Parmar, B. S. (2010). Triterpenic saponins as regulator of plant growth. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 83(2), 189-195.
- Visentin, I., Gentile, S., Valentino, D., Gonthier, P., and Cardinale, F. (2012). *Gnomoniopsis castanea* sp. nov. (Gnomoniaceae, Diaporthales) as the causal agent of nut rot in sweet chestnut. *Journal of Plant Pathology*, 411-419.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. (eds.): PCR protocols: a guide to methods and applications. 315-322. Academic Press, Inc. London.
- Wink, M. (1988). Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics*, 75, 225-233.

Xu, Z., Li, X., Feng, S., Liu, J., Zhou, L., Yuan, M., and Ding, C. (2016). Characteristics and bioactivities of different molecular weight polysaccharides from camellia seed cake. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 1025-1032.