

Efecto de aceites esenciales y componentes seleccionados sobre *Heterorhabditis amazonensis* Andaló et al. cepa HC1



<https://eqrcode.co/a/q1TgcG>

Effect of essential oils and selected components on *Heterorhabditis amazonensis* Andaló et al. strain HC1

Oriela Pino Pérez^{1*}, Damiana Roselló García², Belkis Peteira Delgado-Oramas¹, Roberto Enrique Regalado¹, Heleana Miranda Cabrera¹, Mayra G. Rodríguez Hernández^{1*}

¹Grupo de Plagas Agrícolas, Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

²Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana “Fructuoso Rodríguez Pérez” (UNAH). Apartado 10. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: Se investigó en laboratorio el efecto de cuatro aceites esenciales (*Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake; *Citrus sinensis* (L.) Osbeck; *Piper aduncum* subsp. *ossanum* (C. DC.) Saralegui y *Piper auritum* Kunth) y 11 componentes seleccionados sobre los juveniles infectivos (JI) *Heterorhabditis amazonensis* Andaló et al. cepa HC1. Se determinó la susceptibilidad de esta cepa a siete disolventes orgánicos y tensoactivos por inmersión. Los efectos tóxicos letales de los aceites y componentes sobre los JI se evaluaron por exposición directa en placas de 24 pocillos (24 h). El bioensayo de infectividad Uno-Uno se utilizó para evaluar el efecto tóxico subletal de los aceites esenciales sobre los JI. Los datos de los ensayos del efecto tóxico letal de disolventes orgánicos /tensoactivos y de componentes de aceites esenciales se sometieron a ANOVA y las medias se compararon (Duncan; 0, 05 %); mientras que, los del ensayo del efecto tóxico subletal, se analizaron mediante comparación múltiple de proporciones (Método de Wald, nivel de confianza de 0,05). El Tritón X-100 al 0,5 % evidenció baja toxicidad sobre los JI y se puede utilizar en ensayos de compatibilidad de productos químicos con esta cepa. Los aceites esenciales de *M. quinquenervia* y *C. sinensis* no provocaron un efecto tóxico letal significativo sobre los JI de *H. amazonensis* cepa HC1; los aceites de *P. aduncum* subsp. *ossanum* y *P. auritum* produjeron moderada mortalidad. Estos cuatro aceites esenciales no causaron efectos subletales sobre la infectividad de los JI de *H. amazonensis* cepa HC1. Los componentes de aceites esenciales canfeno, *p*-cimeno y piperitona no afectaron a los JI de *H. amazonensis* cepa HC1; 1,8-cineol, limoneno, alcanfor y metil chavicol mostraron toxicidad moderada y carvacrol, eugenol, linalol y timol fueron altamente tóxicos a los JI. De acuerdo con los parámetros evaluados, los aceites esenciales de *M. quinquenervia* y *C. sinensis* y los componentes canfeno, *p*-cimeno y piperitona son compatibles con *H. amazonensis* cepa HC1.

Palabras clave: aceites esenciales, control biológico, nematodos entomopatógenos.

ABSTRACT: The effect of four essential oils and eleven selected components on the infective juveniles (IJ) of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis amazonensis* Andaló et al. strain HC1 was studied under laboratory conditions. Susceptibility of this strain to seven organic solvents and surfactants was determined. The lethal and sublethal toxic effects on IJ exposed directly to the essential oils and components were evaluated in 24 well plates for 24 h. Data of lethal toxic effects were subjected to ANOVA and the means compared by Duncan's multirange test at 0,05 %, whereas data of sublethal toxic effects were analyzed by the multiple comparison of proportions (Wald's Method, confidence level of 0,05). Toxicity of Triton X-100 at 0,5 % on *H. amazonensis* strain HC1 was low and could be used in bioassays of chemical product compatibility with this nematode strain. The essential oils of *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck caused no significant lethal toxic effect on IJ of *H. amazonensis* (strain HC1), while those of *Piper aduncum* subsp. *ossanum* (C. DC.) Saralegui and *Piper auritum* Kunth produced moderate mortality. No sublethal effects were caused by these four oils on the infectivity of IJ of *H. amazonensis* strain HC1. The essential oil components camphene, *p*-cymene and piperitone did not affect IJ of *H. amazonensis* strain HC1; 1,8-cineole, limonene, camphor, and methyl chavicol showed moderate toxicity, and carvacrol, eugenol, linalool, and thymol were highly toxic. According to the parameters evaluated, the essential oils from *M. quinquenervia* and *C. sinensis* and the components camphene, *p*-cymene, and piperitone were compatible with *H. amazonensis* strain HC1.

Key words: essential oils, biological control, entomopathogenic nematode.

*Correspondencia a: Oriela Pino Pérez y Mayra G. Rodríguez Hernández.

E-mail: oriela@censa.edu.cu, mrguez@censa.edu.cu

Recibido: 20/11/2020

Aceptado: 07/01/2021

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son mezclas de componentes volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas constituidos, generalmente, por monoterpenos, sesquiterpenos, sus derivados oxigenados (tales como aldehídos, cetonas alcoholes) y fenilpropanoides (1). Estas sustancias se destacan como productos con un rápido desarrollo y múltiples posibilidades de aplicación en la agricultura, por su toxicidad frente a un amplio espectro de microorganismos, insectos y ácaros plagas (2). Además, estas mezclas multicomponentes pueden combinar diferentes modos de acción y ser valiosas en la protección de cultivos, al mitigar el desarrollo de resistencia (3).

El uso de plaguicidas basados en los aceites esenciales y sus componentes resulta especialmente ventajoso pues pueden conjugar buena eficacia, amplio espectro de acción, toxicidad mínima en mamíferos, elevada disponibilidad general y los métodos de obtención son relativamente simples (2, 3, 4). Estos compuestos naturales no contaminan el medio ambiente y por ser sustancias volátiles, cuya aplicación provoca bajos niveles de residuos, se permite el reingreso rápido de los agricultores al campo y su aplicación en los productos de las cosechas (4).

Los aceites esenciales (uno o la mezcla de varios), sus componentes y combinaciones de estos últimos, obtenidos sintéticamente, constituyen ingredientes activos de insecticidas comerciales (3). Su uso es autorizado en agricultura y apicultura orgánicas; en países como Canadá y Estados Unidos, los productos basados en aceites esenciales o algunos de sus componentes (alcanfor, timol) están exentos de registro (4). En Cuba, diferentes aceites esenciales evidenciaron una actividad biológica promisorio sobre diversas plagas agrícolas; resultados que constituyen la base para su desarrollo como productos fitosanitarios y su inserción en los programas de manejo de diferentes cultivos claves para la seguridad alimentaria y nutricional en el país (5, 6, 7).

Los nematodos entomopatógenos (NEP) de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* desarrollaron una relación simbiótica-mutualista con bacterias entomopatógenas de los géneros *Photobacterium* y *Xenorhabdus*, respectivamente (8). La aplicación de estos nematodos como agentes de control biológico progresó rápidamente por su eficacia, amplio espectro de acción, factibilidad de su reproducción masiva y la seguridad para mamíferos y el medio ambiente (9, 10, 11). La especie *Heterorhabditis amazonensis* Andalo *et al.* se describió en Brasil y en Cuba, la cepa HC1 se produce masivamente en más de dos decenas de laboratorios y se utiliza para el manejo de diversas plagas en cultivos como col de repollo (*Brassica oleracea capitata* B.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y boniato (*Ipomoea batatas* Lam.) y, en menor medida, en café (*Coffea*

spp.), cítricos (*Citrus* spp.) y maíz (*Zea mays* L.), entre otros (12,13).

Los fertilizantes y plaguicidas químicos pueden tener efectos positivos, neutros o negativos sobre los nematodos entomopatógenos (14). La toxicidad puede variar en dependencia de los compuestos, la concentración, la especie y estado de los nematodos (15, 16, 17, 18), lo que hace que la extrapolación de resultados sea poco confiable; por lo tanto, cada producto candidato para un sistema de manejo integrado de plagas (MIP) debe ser evaluado individualmente. Algunos plaguicidas químicos (metomilo, paratión) son tóxicos a estos agentes de control biológico, otros (clorpirifos, endosulfán) son compatibles y algunos (teflutrin, imidacloprid) actúan sinérgicamente en el MIP (15).

La utilización, cada vez mayor, de aceites esenciales en el manejo de plagas hace muy probable que se combinen con los NEP ya disponibles con este propósito en diferentes cultivos, incluso en algunos casos será ventajoso para el agricultor la mezcla y aplicación simultánea de estos agentes bioactivos. Sin embargo, la información disponible sobre acción de los aceites esenciales y sus componentes sobre estos agentes de control biológico es escasa (14).

El uso conjunto de NEP y otros productos como aceites esenciales y sus componentes debe estar precedido de estudios de compatibilidad (18,19). Estos estudios comprenden la determinación de la toxicidad letal de los productos sobre cada especie y cepa en particular, así como la evaluación de efectos subletales relacionados con la infectividad y movilidad de los juveniles infectivos (18, 19). Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de aceites esenciales procedentes de cuatro especies de plantas que crecen en Cuba (una cultivada y tres silvestres) y de algunos componentes de aceites bioactivos sobre *H. amazonensis* cepa HC1 en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta del material vegetal y obtención de los aceites esenciales

Se estudiaron cuatro aceites esenciales obtenidos a partir de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (naranja dulce, *Rutaceae*), *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake (Melaleuca, *Myrtaceae*), *Piper aduncum* subsp. *ossanum* (C. DC.) Saralegui (Platanillo de Cuba, *Piperaceae*) y *Piper auritum* Kunth (Caisimón de anís, *Piperaceae*). Las especies se identificaron por comparación con las descripciones botánicas en la literatura y las colecciones del Herbario Johannes Bisse, del Jardín Botánico Nacional de Cuba.

El material vegetal de las cuatro especies vegetales se recolectó en localizaciones geográficas de la región occidental de Cuba, de tres de ellas se procesaron sus hojas y de una los frutos. Las hojas de

M. quinquenervia provinieron de la Ciénaga de Zapata, Provincia Matanzas y las de las dos especies del género *Piper* del Parque “Escaleras de Jaruco”, Provincia Mayabeque; mientras que, los frutos de *C. sinensis* se cosecharon en Jagüey Grande, Provincia Matanzas.

Para la obtención de los aceites esenciales de *M. quinquenervia*, *P. aduncum* subsp. *ossanum* y *P. auritum* se seleccionaron las hojas no dañadas. El material vegetal se procesó fresco, excepto el de melaleuca que se secó a temperatura ambiente en la sombra durante ocho días.

Los aceites esenciales de estas tres especies se extrajeron por hidrodestilación con equipo Clevenger durante tres horas, según lo establecido en la norma ISO 65-71:84 (20). Cada aceite se secó sobre sulfato de sodio y se almacenó a 4°C. El aceite de *C. sinensis* se obtuvo por expresión en el Combinado Citrícola Victoria de Girón, Jagüey Grande, Provincia Matanzas, Cuba, luego del procesamiento industrial de los frutos para la obtención de jugos.

Los experimentos se desarrollaron en el Laboratorio de Nematología Agrícola del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Los nematodos entomopatógenos empleados pertenecen a la cepa HC1 de *H. amazonensis* (GenBank: BankIt1899363 Hamaz_HC1 KU870321), seleccionada por Sánchez (21) por su patogenicidad sobre diversas plagas.

Los juveniles infectivos (JI) se obtuvieron en ese laboratorio mediante reproducción masiva *in vivo*, utilizando como biorreactor larvas del último instar de *Galleria mellonella* (Fabricius), siguiendo el procedimiento establecido por Sánchez *et al.* (22) y los sustratos sugeridos por Enrique *et al.* (23). Las colectas de nematodos se efectuaron a los 12 días. Estos se preservaron a una temperatura de 23±1°C en solución acuosa y posteriormente se utilizaron en los experimentos *in vitro*.

Determinación de efecto tóxico letal de disolventes orgánicos y tensoactivos sobre *H. amazonensis* cepa HC1

En este bioensayo se utilizaron placas plásticas de 24 pocillos; en cada uno de ellos se añadieron consecutivamente 100 µl de agua destilada conteniendo los JI (al menos 20), 200 µl de agua destilada y 300 µl de solución del tratamiento correspondiente (19). Las placas se colocaron a temperatura ambiente y transcurridas 24 horas se contabilizó el número de nematodos vivos y muertos en cada pocillo (19, 24). Los nematodos se consideraron muertos si su cuerpo estaba recto y no se movían aún después del estímulo mecánico (16, 19).

Soluciones de cuatro disolventes orgánicos y tres tensoactivos, utilizados comúnmente para disolver los aceites esenciales y sus componentes, se prepararon a dos concentraciones, por dilución seriada, con agua destilada (Tabla 1) (9, 25). En el control se adicionó agua destilada.

Se utilizó un diseño completamente al azar y ocho réplicas por tratamiento. Los datos de mortalidad se transformaron en $\arcseno(\sqrt{p})$ y se realizó análisis de varianza simple, las medias se contrastaron por medio de la prueba de rangos múltiples de Duncan con nivel de significación de 0,05.

Determinación de efecto tóxico letal de los aceites esenciales sobre *H. amazonensis* cepa HC1

Para la evaluación del efecto tóxico letal se siguió el procedimiento descrito anteriormente. Los aceites esenciales de platanillo de Cuba, caisimón de anís, melaleuca y naranjo dulce, se mezclaron con la solución acuosa de la sustancia disolvente seleccionada y se evaluaron a una concentración final, en el pocillo, de 0,5 %.

Tabla 1. Disolventes orgánicos y tensoactivos utilizados para solubilizar los aceites esenciales y sus componentes /Organic solvents and surfactants used to dissolve the essential oils and their components

Tratamiento	Concentración final/pocillo (%)	Proveedor
H ₂ O		
Acetona	2	LPV 13-03-2013 (99,5 %)
Acetona	1	
Etanol	2	Merck (absoluto para análisis)
Etanol	1	
Metanol	2	Burdick Jackson (HPLC)
Metanol	1	
DMSO	2	Merck
DMSO	1	
Tween 80	0,5	Riedel de Haën
Tween 80	0,25	
Tween 20	0,5	Riedel de Haën
Tween 20	0,25	
Triton X-100	0,5	Scharlau (98 %)
Triton X-100	0,25	

Se utilizó un control con agua destilada y otro con la sustancia disolvente seleccionada a la concentración que no afectó significativamente a los JI de *H. amazonensis* cepa HC1. Se utilizó un diseño completamente al azar y se realizaron 12 réplicas por tratamiento. Los datos de mortalidad se transformaron en arcoseno (\sqrt{p}) y se realizó análisis de varianza simple, las medias se contrastaron por medio de la prueba de rangos múltiples de Duncan con nivel de significación de 0,05.

Determinación de efecto tóxico subletal de los aceites esenciales sobre *H. amazonensis* cepa HC1

El bioensayo de infectividad Uno-Uno se utilizó para evaluar el efecto tóxico subletal de los aceites esenciales sobre *H. amazonensis* cepa HC1. Este ensayo se basa en la capacidad de un juvenil infectivo de nematodo entomopatógeno de infectar y provocar la muerte a una larva del insecto diana y es recomendado como bioensayo para el control de calidad de lotes de estos agentes de control biológico (26).

Larvas del último instar de *G. mellonella* de 0,2 g de peso se utilizaron como insecto diana. Los nematodos utilizados en este bioensayo fueron los JI sobrevivientes del ensayo de evaluación del efecto tóxico letal de los aceites esenciales.

Se colocó una larva de *G. mellonella* sobre un disco de papel de filtro (Whatman 1), humedecido con agua destilada, ubicado en el fondo de un pocillo; se utilizaron placas de 24 pocillos. Un nematodo individual, proveniente de la suspensión de los diferentes tratamientos, se transfirió en 100 μ l de agua destilada que se aplicaron sobre cada larva, bajo un microscopio STEMI DV4®. En cada pocillo se colocó un disco de malla, para evitar que la larva del insecto se moviera hacia la superficie superior, la placa se cubrió con su tapa plástica y se selló con papel Parafilm. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente.

El número de insectos vivos y muertos se contabilizó a las 48 horas de realizada la aplicación y se calculó la mortalidad correspondiente. Los insectos se consideraron muertos si se mantuvieron inmóviles y adquirieron la coloración rojiza característica (12).

Se utilizó un control con los nematodos tratados con agua destilada y otro con la sustancia disolvente seleccionada, a la concentración que no afectó significativamente a los JI de *H. amazonensis* cepa HC1. Se utilizó un diseño completamente al azar y se realizaron 24 réplicas por tratamiento.

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante una comparación múltiple de proporciones, por el método de Wald para un nivel de confianza de 0,05. Se utilizó el Software estadístico CompaProWin_2.0.1 desarrollado en el CENSA (28).

Determinación de efecto tóxico letal de componentes de aceites esenciales sobre *H. amazonensis* cepa HC1

Se estudió el efecto de 11 componentes de aceites esenciales. Estos compuestos se seleccionaron por su presencia en ingredientes activos de productos comerciales basados en aceites esenciales y/o sus componentes (2, 3) y/o por encontrarse en la composición de aceites esenciales identificados como promisorios para el desarrollo de nuevos plaguicidas (5, 6, 7, 27). (Tabla 2)

Los componentes se mezclaron con la solución acuosa de la sustancia disolvente seleccionada y se evaluaron a una concentración final, en el pocillo, de 0,5 %. Se utilizaron dos controles, uno con agua destilada y otro con la sustancia disolvente seleccionada a la concentración que no afectó significativamente a los JI de *H. amazonensis* cepa HC1.

Se utilizó un diseño completamente al azar y se realizaron 12 réplicas por tratamiento. Los datos de mortalidad se transformaron en arcoseno(\sqrt{p}) y se realizó análisis de varianza simple, las medias se contrastaron por medio de la prueba de rangos múltiples de Duncan con nivel de significación de 0,05.

Los nematodos muertos por la exposición a los tratamientos con componentes de aceites esenciales que provocaron una mortalidad superior al 50 % se observaron con Microscopio Leica (60 y 100 X). Para la observación de los daños se utilizó un sistema de fotodocumentación y el Software Leica Application Suite V3.

Tabla 2. Componentes seleccionados de aceites esenciales que se utilizaron en el ensayo con *H. amazonensis* cepa HC1 / Selected components of essential oils used in *H. amazonensis* strain HC1 bioassay

Componentes seleccionados	Grupo químico
Canfeno	hidrocarburo monoterpénico
<i>p</i> -cimeno	hidrocarburo monoterpénico
Piperitona	monoterpenoide, cetona
1,8-cineol	monoterpenoide, éter
Limoneno	hidrocarburo monoterpénico
Alcanfor	monoterpenoide, cetona
Metil chavicol	monoterpenoide, éter
Carvacrol	monoterpenoide, fenol
Eugenol	Fenil propanoide
Linalol	monoterpenoide, alcohol
Timol	monoterpenoide, fenol

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto tóxico letal de disolventes orgánicos y tensoactivos sobre *H. amazonensis* cepa HC1

Los JI de *H. amazonensis* cepa HC1 evidenciaron la tendencia a una mayor susceptibilidad a los disolventes orgánicos (Tabla 3). Los tratamientos con Etanol (1 %), Tween 20 (0,25 y 0,5 %) y Tritón X-100 (0,25 y 0,5 %) no provocaron una mortalidad significativa de los JI. El Tritón X-100 al 0,5 % causó el menor número de muertes en los nematodos tratados.

La evaluación biológica de sustancias poco solubles en agua, tales como los aceites esenciales y sus componentes, requiere la modificación de métodos de ensayos tradicionales desarrollados para sustancias hidrofílicas (29). El aumento de la biodisponibilidad, en el medio de ensayo, de metabolitos secundarios poco solubles en agua se logra mediante la utilización de disolventes orgánicos y tensoactivos en bajas concentraciones. Sin embargo, la susceptibilidad de los organismos diana puede variar en dependencia del género, la especie e incluso la cepa; es por ello que resulta de gran importancia la adecuación de los ensayos a cada organismo específico (29).

El Tritón X-100 se utilizó con anterioridad en ensayos de determinación del efecto de terpenos, terpenoides y aceites esenciales sobre *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle, sin provocar toxicidad sobre este nematodo fitoparásito (13, 24). Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los emanados de esa investigación precedente y amplían el espectro de utilización de este tensoactivo en ensayos biológicos.

El Tritón X-100 al 0,5 % posee baja toxicidad sobre *H. amazonensis* cepa HC1 y se puede utilizar en ensayos de compatibilidad de productos químicos con esta cepa de nematodos entomopatógenos. Este tensoactivo se seleccionó para la solubilización de las muestras en los bioensayos de compatibilidad de aceites esenciales y sus componentes con la cepa de nematodos entomopatógenos estudiada.

Efecto tóxico letal de aceites esenciales sobre *H. amazonensis* cepa HC1

Los porcentajes de mortalidad de *H. amazonensis* provocados por los aceites aplicados fueron, en todos los casos, inferiores al 15 % (Tabla 4). Los aceites de *M. quinquenervia* y *C. sinensis* no produjeron efecto tóxico significativo sobre los juveniles; mientras que, los de *P. auritum* y *P. aduncum* subsp. *ossanum* causaron mortalidades que difirieron estadísticamente de las obtenidas para el control con Tritón X-100. Este último aceite fue mejor tolerado por los nematodos, pues la mortalidad fue menor de 10 % (18).

En la literatura consultada no se encontró información sobre el efecto de estos aceites sobre *H. amazonensis*. La cepa HC1, utilizada en el presente estudio, fue aislada a partir de suelos cubanos y por tanto su sensibilidad a los diferentes tratamientos puede estar influenciada por su posible adaptación genética a diferentes factores bióticos y abióticos presentes en el ecosistema (31). Los resultados indican que los aceites de *M. quinquenervia* y *C. sinensis* pueden mezclarse con estos nematodos entomopatógenos y realizar aplicaciones simultáneas, sin que se afecte la sobrevivencia de los juveniles infectivos.

Tabla 3. Efecto tóxico letal de disolventes orgánicos y tensoactivos sobre *Heterorhabditis amazonensis* cepa HC1 / Lethal toxic effect of organic solvents and surfactants on *Heterorhabditis amazonensis* strain HC1

Tratamiento (Concentración final pocillo)	Mortalidad JI (Media ± EE, %) ¹
Control Agua	6,32 ± 2,95 d
Acetona (1 %)	18,10 ± 2,78 bc
Acetona (2 %)	23,74 ± 3,44 abc
Metanol (1 %)	24,16 ± 3,86 abc
Metanol (2 %)	24,23 ± 3,79 abc
Etanol (1 %)	15,65 ± 5,43 cd
Etanol (2 %)	24,59 ± 5,52 abc
DMSO (1 %)	35,91 ± 7,31 ab
DMSO (2 %)	40,83 ± 6,24 a
Tween 20 (0,25 %)	12,09 ± 3,98 cd
Tween 20 (0,50 %)	18,10 ± 5,52 cd
Tween 80 (0,25 %)	26,65 ± 5,50 abc
Tween 80 (0,50 %)	22,18 ± 3,53 abc
Tritón X-100 (0,25 %)	11,16 ± 2,41 cd
Tritón X-100 (0,50 %)	6,70 ± 2,81 d

¹Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$; Prueba de Duncan)

Tabla 4. Efecto tóxico letal de aceites esenciales de *Citrus sinensis*, *Melaleuca quinquenervia*, *Piper aduncum* subsp. *ossanum* y *Piper auritum* sobre *Heterorhabditis amazonensis* cepa HC1 / Lethal toxic effect of essential oils from *Citrus sinensis*, *Melaleuca quinquenervia*, *Piper aduncum* subsp. *ossanum*, and *Piper auritum* on *Heterorhabditis amazonensis* strain HC1

Tratamiento	Mortalidad JI (Media ± EE, %) ²
Agua	3,84 ± 1,54 bc
Tritón X-100 ¹	2,96 ± 1,69 c
<i>Citrus sinensis</i> ¹	2,48 ± 1,15 c
<i>Melaleuca quinquenervia</i> ¹	7,62 ± 2,60 abc
<i>Piper aduncum</i> subsp. <i>ossanum</i> ¹	8,54 ± 2,02 ab
<i>Piper auritum</i> ¹	14,26 ± 4,31 a

¹Concentración final en el pocillo de 0,5 %, ²Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$; Prueba de Duncan)

En condiciones de laboratorio, estudios precedentes de compatibilidad de nematodos entomopatógenos con diferentes tipos de agroquímicos comerciales utilizan tiempos de evaluación entre 3 y 120 horas (12, 14, 25, 26). La determinación de la mortalidad transcurridas 24 horas de exposición permite valorar el efecto que, sobre el agente de control biológico, tendría la mezcla directa con las sustancias evaluadas (34); sin embargo, si esta mezcla se realizara solo en el momento de la aplicación a los cultivos, el tiempo de contacto en estas condiciones sería menor. Por ello, sería conveniente valorar la realización de nuevos bioensayos con menores tiempos de exposición para los aceites del género *Piper* que no afecten a los nematodos entomopatógenos, lo que permitiría emitir recomendaciones a los productores para su uso seguro.

Efecto tóxico subletal de aceites esenciales sobre *H. amazonensis* cepa HC1

Los JI, sobrevivientes del ensayo de evaluación del efecto tóxico letal de los cuatro aceites esenciales, produjeron porcentajes de mortalidad, en larvas de *G. mellonella*, superiores al 60 % en el ensayo uno-uno (Tabla 5.). No se evidenciaron diferencias significativas de los tratamientos con el control ni entre ellos, lo que indica que no se afectó la infectividad de los JI por la exposición de éstos, durante 24 horas, a los aceites esenciales de *C. sinensis*, *M. quinquenervia*, *P. aduncum* subsp. *ossanum* y *P. auritum*.

Los valores de mortalidad de *G. mellonella* se encuentran dentro del rango esperado en el ensayo, según resultados obtenidos en evaluaciones de calidad de agentes de control biológico comerciales basados en diferentes cepas de nematodos entomopatógenos (26). Las larvas, al morir, adquirieron la coloración marrón oscuro o rojizo que provoca esta cepa, de acuerdo a la escala emitida para la cepa (12) para evaluar la mortalidad por nematodos entomopatógenos en *G. mellonella*; lo que indicó que las larvas, empleadas en el ensayo, murieron por el efecto de nematodos entomopatógenos y no por otras causas.

En la literatura consultada se encontró un estudio que refiere la aplicación conjunta de aceites esenciales y nematodos entomopatógenos sobre *Heterocrir littoralis* Rambur. Los ensayos realizados se focalizaron en determinar el efecto insecticida sobre este saltahoja de combinaciones de aceites esenciales con *H. bacteriophora* y *Heterorhabditis indica* Poinar et al., se observó que el número de JI que emergían de los cadáveres de los insectos tratados con estas mezclas fue menor en comparación con los controles en todas las variantes experimentales (9) aunque no se aclara la causa de esta reducción asociada a los aceites. Es significativo resaltar que los mayores valores se obtuvieron para el aceite de *Eucalyptus globulus* Labill, especie perteneciente a la familia de las Mirtáceas al igual que *M. quinquenervia*, que en el presente estudio también provocó una toxicidad baja sobre los JI.

Tabla 5. Efecto tóxico subletal de los aceites esenciales *Piper aduncum* subsp. *ossanum*, *Piper auritum*, *Melaleuca quinquenervia* y *Citrus sinensis* sobre *Heterorhabditis amazonensis* cepa HC1 / Sublethal toxic effect of essential oils from *Citrus sinensis*, *Melaleuca quinquenervia*, *Piper aduncum* subsp. *ossanum* and *Piper auritum* on *Heterorhabditis amazonensis* strain HC1

Tratamiento	Mortalidad <i>Galleria mellonella</i> (%) ²
Agua	63,64 a
Tritón X-100 ¹	91,67 a
<i>Citrus sinensis</i> ¹	91,67 a
<i>Melaleuca quinquenervia</i> ¹	91,67 a
<i>Piper aduncum</i> subsp. <i>ossanum</i> ¹	83,33 a
<i>Piper auritum</i> ¹	63,64 a

¹Concentración final en el pocillo de 0,5 %, ²Valores con letras iguales no difieren estadísticamente ($p < 0,05$; método de Wald)

Es importante complementar el análisis de los datos obtenidos en el ensayo de toxicidad letal con el de los resultados relacionados con efectos subletales que afecten la capacidad de los nematodos de invadir y matar al insecto. La inhibición de la atracción del hospedante, reproducción y/o desarrollo puede incidir en la infectividad y consecuentemente la eficacia de los nematodos (17,18). Por otro lado, estos aceites esenciales poseen actividad antimicrobiana establecida y pudieran tener efectos negativos sobre la bacteria simbiote y, consecuentemente, disminuir la infectividad de los JI (35).

Los aceites de melaleuca y naranjo dulce no provocaron niveles de mortalidad significativos o afectación en la infectividad, lo que sugiere que podrán ser utilizados simultáneamente con los NEP en programas de manejo integrado de plagas. Esto reviste importancia práctica, pues los productores podrían hacer aplicaciones donde mezclen los nematodos entomopatógenos y los aceites de estas dos plantas, que se encuentran disponibles en el país.

De manera general, los resultados obtenidos contribuyen a aumentar el conocimiento existente sobre ambos tipos de agentes bioactivos. Específicamente, se aporta al estudio de la biodiversidad de nuestro país pues la cepa de nematodos utilizada se aisló en un ecosistema local y se evaluó el efecto de aceites esenciales obtenidos a partir de especies vegetales desarrolladas en las condiciones geoclimáticas de Cuba y una de ellas (*P. aduncum* subsp. *ossanum*) es una planta endémica.

Efecto tóxico letal de componentes de aceites esenciales sobre *H. amazonensis* cepa HC1

Los componentes estudiados están presentes en el ingrediente activo de productos comerciales, ya sea como parte de aceites esenciales o en forma de mezclas artificiales (2,3); también se detectaron en la com-

posición de aceites que se identificaron como candidatos promisorios para el desarrollo de nuevos plaguicidas en Cuba (5, 6, 7, 27). Se evidenció que el canfeno, el *p*-cimeno, la piperitona y el 1,8-cineol no afectaron significativamente (efecto tóxico letal) los JI de la cepa HC1 de *H. amazonensis*. (Tabla 6)

La baja toxicidad evidenciada por el 1,8-cineol se corresponde con la mostrada por el aceite de *M. quinquenervia*; en cuya composición, este monoterpenoide representó el 25,4 % (5). El canfeno, la piperitona y el alcanfor son componentes mayoritarios del aceite de *P. aduncum* subsp. *ossanum* (6), la toxicidad del aceite puede deberse a un efecto aditivo, siendo el alcanfor el de mayor aporte de estos tres componentes y/o a la contribución de otros componentes.

El porcentaje de JI muertos por la exposición a limoneno fue inferior al 5 %, difirió significativamente del control con Tritón X-100, pero no del valor de mortalidad de los juveniles mantenidos en agua. Este terpeno estuvo presente en el aceite de *C. sinensis* en una abundancia relativa del 95 %, la menor toxicidad provocada por el aceite pudiera atribuirse a que este compuesto, como parte del aceite, se evaluó a una concentración ligeramente menor o a que los componentes minoritarios ejercen un efecto antagónico.

Los componentes alcanfor y metilchavicol provocaron mortalidades inferiores al 20 %, con valores que difirieron estadísticamente de los controles. El primer compuesto fue menos tóxico, pues más del 90 % de los JI sobrevivieron transcurridas las 24 horas de exposición (18). Aunque esta toxicidad es baja (18), se recomienda evaluar el efecto de estos terpenoides a menores tiempos de contacto directo.

Los componentes carvacrol, eugenol, linalol y timol fueron altamente tóxicos a los JI de la cepa estudiada y produjeron mortalidades superiores al 50 %, en orden ascendente hasta causar la muerte del 100 %

Tabla 6. Efecto tóxico letal de componentes de aceites esenciales sobre *Heterorhabditis amazonensis* cepa HC1 / Toxic lethal effect of essential oils components on *Heterorhabditis amazonensis* strain HC1

Tratamiento	Mortalidad JI (Media ± EE, %) ²
Agua	0,80 ± 0,54 fg
Tritón X100 ¹	0,36 ± 0,36 g
Canfeno ¹	0,96 ± 0,96 fg
<i>p</i>-cimeno ¹	1,78 ± 1,00 efg
Piperitona ¹	2,14 ± 0,98 efg
1,8-cineol ¹	3,69 ± 1,41 efg
Limoneno ¹	4,24 ± 1,35 ef
Alcanfor ¹	5,89 ± 1,69 e
Metilchavicol ¹	17,23 ± 4,25 d
Carvacrol ¹	53,83 ± 6,92 c
Eugenol ¹	67,60 ± 4,41 b
Linalol ¹	97,48 ± 0,76 a
Timol ¹	100,00 ± 0,00 a

¹Concentración final en el pocillo de 0,5 %, ²Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05, Prueba de Duncan)

de los juveniles tratados. En estudios previos, estos compuestos manifestaron actividad nematocida sobre especies perteneciente a los géneros *Meloidogyne* y *Bursaphelenchus*, lo cual podría explicar la acción letal observada (16, 36). El efecto sobre estos fitoparásitos se evidenció a concentraciones inferiores a la utilizada en la presente evaluación; por lo tanto, con fines nematocidas podría considerarse la aplicación conjunta de los nematodos entomopatógenos con estas sustancias y/o aceites esenciales que las contengan a concentraciones intermedias entre la que produce el efecto plaguicida sobre los nematodos fitoparásitos y la que no sea tóxica a los entomopatógenos.

En cuanto a la relación estructura-actividad, dentro del grupo de componentes evaluados el *p*-cimeno, la piperitona, el carvacrol y el timol poseen en común un anillo aromático sustituido en posición *para* por un grupo metilo y uno isopropilo. El hidrocarburo (*p*-cimeno) y la cetona (piperitona) no fueron tóxicos a *H. amazonensis*; mientras que, los fenoles sí lo fueron.

Los cuatro compuestos que provocaron los mayores porcentajes de mortalidad, valores que difirieron estadísticamente de los del resto de los hidrocarburos monoterpénicos y monoterpénoides, poseen un grupo hidroxilo en sus estructuras (Fig. 1); lo que indica que la presencia de este grupo funcional podría estar asociada al efecto biológico observado. La posición del grupo hidroxilo también influyó en la toxicidad, pues la mortalidad en JI causada por el carvacrol (hidroxilo en posición *meta*) fue inferior a la del timol (hidroxilo en posición *orto*).

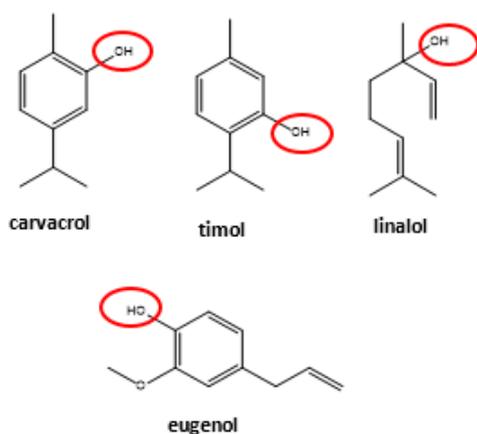


Fig. 1. Estructura de los componentes de aceites esenciales tóxicos a *Heterorhabditis amazonensis* (cepa HC1) / Structure of the essential oil components toxic to *Heterorhabditis amazonensis* strain HC1

Los resultados confirman los informados previamente, al determinar la toxicidad de varios monoterpénoides sobre el nematodo fitoparásito *B. xylophilus*, en relación con las diferencias significativas en la actividad nematocida entre grupos funcionales. En esta investigación precedente, alcoholes y fenoles fueron, generalmente, más tóxicos a este nematodo fitoparásito,

destacando la actividad nematocida potente del carvacrol y el timol entre los compuestos evaluados (16). Las evidencias obtenidas sobre la relación entre la toxicidad de estos compuestos a los nematodos entomopatógenos y los grupos funcionales presentes y su posición, son novedosos; estos aspectos deben ser objeto de investigaciones futuras que permitan profundizar en el modo de acción.

La observación al microscopio de las larvas muertas tras la exposición a los cuatro tratamientos que causaron mayor toxicidad evidenció el desorden en la disposición del contenido interno de los nematodos y se apreció la formación de vacuolas o gránulos grandes en todos los casos (Fig. 2). En la región cefálica fue evidente la contracción del cuerpo y el desprendimiento de la cutícula (Fig. 2B y C). El timol provocó mayor vacuolización y desorden interno, así como el colapso interior en algunas regiones (Fig. 2C).

Uno de los principales mecanismos de acción propuestos para los terpenoides consiste en la disrupción de la membrana celular mediante tres posibles vías: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica; cualquiera de estos tres efectos produce la muerte en la célula. El mecanismo de acción implica la degradación de la pared celular, dañando las proteínas de membrana citoplasmática, el enlace de las proteínas, la pérdida del contenido celular y la coagulación del citoplasma (29).

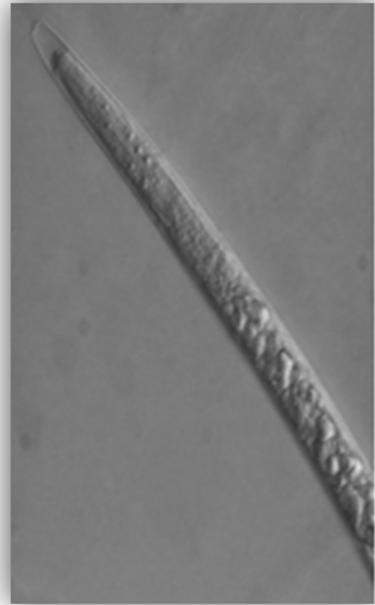
Se plantea que el carvacrol y el timol hacen más permeable la membrana de la célula; el carvacrol forma canales a través de la misma alterando la disposición de los fosfolípidos que la componen y el timol se une hidrofólicamente a las proteínas por medio de enlaces por puente de hidrógeno, provocando cambios en la permeabilidad (35). En el eugenol, el grupo hidroxilo se enlaza a proteínas, provoca el deterioro de la pared celular y un alto grado de lisis (35). Aunque estos estudios se ejecutaron en bacterias, los efectos causados por los compuestos evaluados sobre los nematodos podrían producirse por un modo de acción similar a nivel celular.

La incompatibilidad de los compuestos timol, linalol, eugenol y carvacrol con *H. amazonensis* cepa HC1 puede manejarse por la selección de un intervalo de tiempo apropiado entre las aplicaciones, cuya extensión dependerá de la persistencia de las sustancias sobre la plaga diana y el cultivo. Aunque la información específica sobre los intervalos de aplicación adecuados es limitada, usualmente se recomienda esperar de una a dos semanas después de la aplicación de insecticidas y nematocidas químicos respectivamente, antes de la aplicación de los nematodos (34). Los aceites esenciales y sus componentes son sustancias volátiles con un bajo efecto residual (4), por ello es probable que no se requiera de un periodo de tiempo muy prolongado y este deberá ser ajustado tomando en cuenta las características de cada ecosistema, aspecto que será objeto de una investigación posterior.



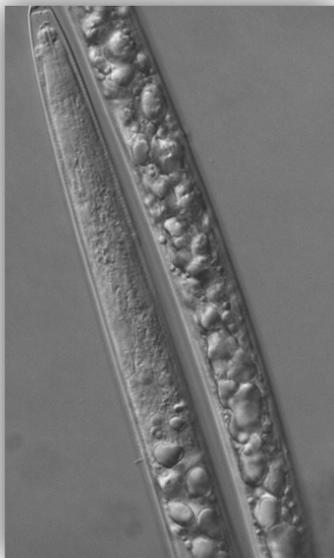
A

carvacrol



B

eugenol



C

timol



D

linalol

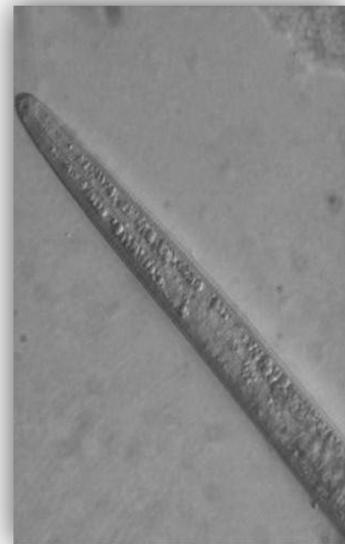


Fig. 2. Alteraciones causadas por componentes de aceites esenciales en J1 de *Heterorhabditis amazonensis* cepa HC1 / Alterations caused by the essential oil components on *Heterorhabditis amazonensis* strain HC1 IJ

La actividad biológica total de los aceites esenciales naturales y las mezclas artificiales es el resultado de efectos aditivos, sinérgicos y/o antagónicos de los diferentes compuestos presentes en sus composiciones. La acción evidenciada por cada uno de los componentes evaluados aporta un valioso conocimiento en cuanto a las posibilidades prácticas de combinación de estas sustancias con *H. amazonensis* cepa HC1.

Aunque los trabajos relacionados con la compatibilidad de nematodos entomopatógenos y plaguicidas botánicos son escasos, se reconoce la importancia de abordar estos aspectos en el proceso de selección de candidatos promisorios para el desarrollo de nuevos productos destinados a la protección de plantas. Los nematodos entomopatógenos no son adecuados para actuar con rapidez y obtener resultados a corto plazo (37) y los aceites esenciales tienen bajo efecto residual, por ello puede ser una alternativa ventajosa la aplicación conjunta de estos tipos de bioproductos o un plaguicida que combine a ambos.

Los aceites esenciales y componentes evaluados serán aplicados en la práctica como formulaciones en cuya composición, además del ingrediente activo, estarán presentes diferentes excipientes y/o surfactantes que podrán incidir en la compatibilidad del producto con los nematodos. Aunque el (los) ingrediente(s) activo(s) hayan demostrado ser compatibles con la cepa de nematodos utilizada en el presente estudio, investigaciones posteriores deberán corroborar este comportamiento con el producto formulado para su utilización en el marco de los diferentes programas de manejo. Las variantes de uso combinado podrían abarcar la utilización conjunta de diferentes productos comerciales basados en nematodos entomopatógenos o en aceites esenciales y/o sus componentes hasta el desarrollo de nuevos formulados cuyo ingrediente activo contenga ambos tipos de agente.

Los aceites esenciales de *C. sinensis* y *M. quinquenervia* y los componentes canfeno, p-cimeno y piperitona, según los parámetros evaluados, no causan efectos negativos sobre la sobrevivencia e infectividad de *H. amazonensis* cepa HC1. Tomando en cuenta, además, el espectro de acción evidenciado hasta el momento por los aceites esenciales y la efectividad sobre diferentes plagas demostrada por el agente de control biológico BionemC, basado en la cepa HC1 de *H. amazonensis*, se podría proponer su uso combinado en programas de manejo integrado de plagas en diferentes cultivos. En hortalizas, caña de azúcar, frijol común, arroz, banana - plátano, se aplicarían estos productos para el manejo de diferentes plagas o de estados de una plaga (5, 7, 12, 27, 38). La implementación futura de la aplicación conjunta de estos agentes bioactivos tiene que estar respaldada por experimentos de campo en estos cultivos, porque las observaciones realizadas a nivel de laboratorio no pueden ser totalmente extrapoladas a las condiciones ambientales.

La eficacia es una característica clave para llegar a un producto comercialmente exitoso; sin embargo, no es la única con la que debe cumplir un producto natural para lograr su inserción en programas de manejo integrado de plagas. Los requisitos prácticos incluyen la compatibilidad con otros agroquímicos pues ningún producto por sí solo logrará solucionar todos los problemas fitosanitarios de un cultivo. Adicionalmente su combinación representa ventajas económicas por la correspondiente reducción en los costos de aplicación. Los elementos novedosos aportados sobre la compatibilidad de plaguicidas botánicos y nematodos entomopatógenos son la base para su uso combinado dentro de los programas de manejo integrado de plagas y contribuyen a potenciar el rol de estos agentes bioactivos en el desarrollo de una producción sostenible de alimentos que conjugue buenos rendimientos agrícolas con un alto valor ecológico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su gratitud a la Dra. C. Hildelisa Saralegui y el Dr. C. Jorge Gutiérrez, del Jardín Botánico Nacional de Cuba, por la identificación de las especies vegetales utilizadas como materia prima para la extracción de aceites esenciales. Al Combinado Citrícola “Victoria de Girón”, Jagüey Grande, Matanzas, por proporcionar muestra del aceite de cítricos. A la Técnico Medio Cecil González Suárez por la recolecta de material vegetal y destilación de los aceites esenciales. De igual modo, los autores agradecen a los árbitros por la revisión del trabajo y sus valiosas sugerencias. Este estudio se desarrolló en el marco de los proyectos “Productos basados en aceites esenciales para el control de plagas en semillas de interés económico” y “Microbial Uptakes for Sustainable management of major banana pests and diseases” (MUSA, 727624; tópico: SFS-11-2016), financiado por la Unión Europea.

REFERENCIAS

1. Singh Chouhan KB, Tandey R, Sen KK, Mehta R, Mandal V. Critical analysis of microwave hydrodiffusion and gravity as a green tool for extraction of essential oils: Time to replace traditional distillation. Trends Food Sci Technol. 2019;92:12-21.
2. Nollet LML, Rathore HS. Green Pesticides Handbook Essential Oils for Pest Control. Nollet LML, Rathore HS, editors. Boca Raton, FL: Taylor & Francis, CRC Press; 2017. 3-523 p.
3. Isman MB. Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. Phytochem Rev. 2019;9.

4. Rathore HS. Green Pesticides for Organic Farming: Occurrence and Properties of Essential Oils for Use in Pest Control. In: Nollet LML, Rathore HS, editors. Green Pesticides Handbook: Essential Oils for Pest Control. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, CRC Press; 2017. p. 3-26.
5. Pino O, Sánchez Y, Rojas MM, Rodríguez H, Abreu Y, Duarte Y, *et al.* Composición química y actividad plaguicida del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake. Rev. Protección Veg. 2011;26(3):177-86.
6. Pino O, Sánchez Y, Rodríguez H, Correa T., Demedio J, Sanabria J. Caracterización química y actividad acaricida del aceite esencial de *Piper aduncum* subsp. *ossanum* frente a *Varroa destructor*. Rev. Protección Veg. 2011;26(1):52-61.
7. Duarte Y, Pino O, Infante D, Sánchez Y, Travieso C, Martínez B. Efecto *in vitro* de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. Rev. Protección Veg. 2013;28(1):54-9.
8. Stock SP. Diversity, biology and evolutionary relationships. In: Campos-Herrera R, editor. Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests-Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection. Cham, Switzerland; Heidelberg, Germany; New York, NY, USA; Dordrecht, The Netherlands; London, UK.: Springer; 2015. p. 3-28.
9. Shamseldean MM, A.F. S, Gesraha MA, Montasser SA, Ibrahim SA. Utilization of Entomopathogenic Nematodes Combined with Plant Extracts and Plant Essential Oils against Grasshopper, *Heteracir littoralis*. J Basic Appl Sci Res. 2013;3(11):289-94.
10. Iqbal S, Jones MGK. Nematodes. In: Thomas B, Murray BG, Murphy DJBT, editors. Encyclopedia of Applied Plant Sciences, Volume 3. 2nd ed. Oxford: Academic Press; 2017. p. 113-9.
11. Simmons AM, Wakil W, Qayyum MA, Ramasamy S, Kuhar TP, Philips CR. Lepidopterous Pests: Biology, Ecology, and Management. In: Wakil W, Brust GE, Perring T, editors. Sustainable Management of Arthropod Pests of Tomato. San Diego: Academic Press; 2018. p. 131-62.
12. Rodríguez MG. Entomopathogenic nematodes in Cuba: From laboratories to popular biological control agents for pest management in a developing country. In: Campos-Herrera R, editor. Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests-Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection. Cham, Switzerland; Heidelberg, Germany; New York, NY, USA; Dordrecht, The Netherlands; London, UK: Springer; 2015. p. 343-364.
13. San-Blas E, Campos-Herrera R, Dolinski C, Monteiro C, Andaló V, Garrigós Leite L, *et al.* Entomopathogenic nematology in Latin America: A brief history, current research and future prospects. J Invertebrate Pathol. 2019;165:22-45.
14. Monteiro C, Lage TC de A, Marchesini P, Vale L, Perinotto WM de S, Lopes WZ, *et al.* Combination of entomopathogenic nematodes with acaricides or essential oil of *Lippia triplinervis* against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). Vet Parasitol Reg Stud Reports. 2021;23:100526.
15. Laznik Z, Trdan S. The influence of insecticides on the viability of entomopathogenic nematodes (*Rhabditida*: *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) under laboratory conditions. Pest Manag Sci. 2014; 70(5):784-789. doi: 10.1002/ps.3614.
16. Choi, I-H.; Kim J. Nematicidal activity of monoterpenoids against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). Russ J Nematol. 2007;15(1): 35-40.
17. Laznik Ž, Vidrih M, Trdan S. The effects of different fungicides on the viability of entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* (Filipjev), *S. carpocapsae* Weiser, and *Heterorhabditis downesi* Stock, Griffin & Burnell (*Nematoda: Rhabditida*) under . Chil J Agric Res. 2012;72 (1):62-7.
18. Subramanian S, Muthulakshmi M. Entomopathogenic Nematodes. In: Omkar B, editor. Ecofriendly Pest Management for Food Security. San Diego: Academic Press; 2016. p. 367-410.
19. Castruita-Esparza G, Bueno-Pallero F, Blanco-Pérez ÁR, Dionísio L, Aquino-Bolaños T, Campos-Herrera R. Activity of *Steinernema colombiense* in plant-based oils. J Nematol. 2020;52(e2020-72):1-12.
20. International Standardization Organization (ISO). ISO 6571. Spices, condiments and herbs. Determination of volatile oil content. 1984;88.
21. Sánchez L. *Heterorhabditis bacteriophora* HC1. Estrategia de desarrollo como agente de control biológico de plagas insectiles. Cuba. [Tesis en opción al Título de Doctor en Ciencias Agrícolas]. Universidad Agraria de La Habana, Cuba. 2002. 100 pp.
22. Sánchez L, Rodríguez MG, Gómez L, Soler DM, Hernández MA, Castellanos L, *et al.* Desarrollo de una metodología para la reproducción artificial de nematodos entomopatógenos para el control de plagas en café. Metodologías Depositadas en Centro de Derechos de Autor (<http://www.cenda.cult.cu>), Cuba, número 09613/ 2002; 2001.
23. Enrique R, Sánchez L, Rodríguez MG, Gómez L, Valle Z. Dietas alternativas para la cría de *Galleria mellonella*. Influencia sobre el rendimiento - peso de larvas de *Galleria mellonella* y recobrado de juveniles infectivos. Centro Nacional de Derecho de Autor (CENDA). Deposit number CENDA2874-2006. Ciudad de la Habana, Cuba; 2006.

24. Kim J, Seo S-M, Lee S-G, Shin S-C, Park I-K. Nematicidal Activity of Plant Essential Oils and Components from Coriander (*Coriandrum sativum*), Oriental Sweetgum (*Liquidambar orientalis*), and Valerian (*Valeriana wallichii*) Essential Oils against Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). J Agric Food Chem. 2008;56:7316-20.
25. Adenubi OT, McGaw LJ, Eloff JN, Naidoo V. *In vitro* bioassays used in evaluating plant extracts for tick repellent and acaricidal properties: A critical review. Vet Parasitol. 2018;254:160-71.
26. Glazer I, Lewis EE. Bioassays of Entomopathogenic Nematodes. In: Navon A, Ascher KRS, editors. Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. Wallingford Oxon, UK: CABI Publishing; 2000. p. 229-48.
27. Pino O, Sánchez Y, Rojas MM, Abreu Y, Correa TM. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. Rev Protección Veg. 2012;27(3):181-7.
28. Castillo Duvergel Y, Miranda I. COMPAPROP: Sistema para comparación de proporciones múltiples. Rev Protección Veg. 2014;29(3):231-4.
29. Saad NY, Muller CD, Lobstein A, Muller D, Lobstein A, Muller CD, et al. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. Flavour Fragr J. 2013;28(5):269-79.
30. Choi I-H, Park J-Y, Shin S-C, Kim J, Park I-K. Nematicidal activity of medicinal plant essential oils against the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). Appl Entomol Zool. 2007;42(3):397-401.
31. Stuart R, Gaugler R. Genetic adaptation and founder affect in laboratory populations of the entomopathogenic nematode *Steinernema glasseri*. Can J Zool. 1996;74:164-70.
32. Alumai A, Grewal PS. Tank-mix compatibility of the entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*, with selected chemical pesticides used in turfgrass. Biocontrol Sci Technol. 2004;14(7):725-30.
33. Krishnayya P V, Grewal PS. Effect of Neem and Selected Fungicides on Viability and Virulence of the Entomopathogenic Nematode *Steinernema feltiae*. Biocontrol Sci Technol. 2002;12:259-66.
34. Koppenhofer AM, Grewal PS. Compatibility and Interactions with Agrochemicals and Other Biocontrol Agents. In: Grewal PS, Ehlers R-U, Shapiro-Ilan DI, editors. Nematodes as Biocontrol Agents. Wallingford Oxfordshire UK: CABI Publishing; 2005. p. 363-81.
35. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. Int J Food Microbiol. 2004 Aug;94(3):223-53.
36. Ntalli NG, Caboni P. Botanical nematicides: A review. J Agric Food Chem. 2012;60(40):9929-40.
37. Sherwani SI, Khan HA. Modes of action of biopesticides. In: Biopesticides Handbook. 2015. p. 51-68.
38. Sánchez Y, Correa TM, Abreu Y, Pino O. Efecto del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson. Rev Protección Veg. 2013;28(3):204-10.

Declaración de los autores: Los autores declaran que no poseen conflicto de intereses.

Contribución de los autores: **Oriela Pino Pérez:** conformación de la idea original, búsqueda de bibliografía referente al tema, ejecución técnica, redacción del artículo y revisión de las diferentes versiones de la publicación, hasta la edición final. **Damiana Roselló García:** participó en la búsqueda de información y la ejecución técnica. **Belkis Peteira Delgado-Oramas:** Participó en la concepción del estudio y en la revisión de las diferentes versiones de la publicación y edición. **Roberto Enrique Regalado:** participó en el diseño del estudio y en su ejecución técnica. Reprodujo los nematodos que se emplearon en los ensayos. **Ileana Miranda Cabrera:** participó en la recolección, en el procesamiento estadístico de los datos, en el análisis de los resultados y aportó criterios a tener en cuenta en la versión final del artículo. **Mayra G. Rodríguez Hernández:** participó en la concepción del estudio, búsqueda de bibliografía referente al tema, ejecución técnica, redacción del artículo y revisión de las diferentes versiones de la publicación, hasta la edición final.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)