

COMUNICACIÓN CORTA

Efecto de aceites esenciales sobre cuatro cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels

Danay Infante, B. Martínez, Yaíma Sánchez, Oriela Pino

Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10, San José de las Lajas, CP 32700, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: danay@censa.edu.cu.

RESUMEN: El objetivo de este estudio fue determinar la compatibilidad *in vitro* de cuatro cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels con los aceites esenciales de *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake (Melaleuca), *Piper aduncum* subsp. *ossanum* (C. DC.) Saralegui (Platanillo de Cuba), y *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Naranja dulce). El efecto se evaluó por contacto directo del micelio del hongo con los aceites, y se calculó el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR). El aceite de *C. sinensis* no afectó el crecimiento de ninguna de las cepas de *T. asperellum*. Los aceites de *P. aduncum* subsp. *ossanum* y *M. quinquenervia* ocasionaron una inhibición de 80-95% del crecimiento radial de los aislamientos T.1, T.78 y T.90. Mientras que; sobre el crecimiento del aislamiento T.13 la inhibición fue total. Los resultados obtenidos para el aceite de *C. sinensis* evidenciaron que puede ser aplicado conjuntamente con estas cepas de *Trichoderma*, aspecto importante en el manejo de enfermedades.

Palabras clave: aceites esenciales, *Piper aduncum* subsp. *ossanum*, *Melaleuca quinquenervia*, *Citrus sinensis*.

Effect of essential oils on four strains of *Trichoderma asperellum* Samuels

ABSTRACT: The aim of this study was to determine the *in vitro* compatibility of four strains of *Trichoderma asperellum* Samuels with essential oils from the plant species *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake (Melaleuca), *Piper aduncum* subsp. *ossanum* (C.DC.) Saralegui (Cuban Platanillo) and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Sweet Orange). Such effect was evaluated by the direct contact of the fungal mycelium with the oils; and then the Radial Growth Inhibition Percentage (PICR) was calculated. The oil from *C. sinensis* did not affect the growth of any of the *T. asperellum* strains. The oils from *P. aduncum* subsp. *ossanum* and *M. quinquenervia* caused a growth inhibition of 80-95% on the isolates T.1, T.78 and T.90; whereas on the isolate T.13, the growth inhibition was total. The results obtained made evident that the oil from *C. sinensis* could be applied jointly with these strains of *Trichoderma*, an important aspect in disease management

Key words: essential oils, *Piper aduncum* subsp. *ossanum*, *Melaleuca quinquenervia*, *Citrus sinensis*.

Problemas ecológicos globales de causa antropogénica se pusieron de manifiesto en los últimos años y el cuidado del ambiente preocupa a decisores, investigadores y otros actores sociales a escala planetaria. Entre las acciones que más afectaciones causaron al medio se encuentra el empleo indiscriminado de plaguicidas sintéticos, particularmente los fungicidas, los que ocasionan impactos negativos en la biodiversidad, los agricultores y los propios consumidores de productos agrícolas (1). Por esta razón,

una parte de las investigaciones en esta rama están dirigidas al desarrollo de alternativas para el manejo de plagas, con el fin de disminuir las aplicaciones de estos plaguicidas y con ello, su impacto medioambiental.

En los últimos años se produjo un notable incremento en los estudios encaminados a introducir el uso de microorganismos benéficos en la agricultura. Entre ellos se encuentran los pertenecientes al género

Trichoderma/Hypocrea, debido a su acción biorreguladora frente a una amplia gama de hongos fitopatógenos, causantes de pérdidas importantes en cultivos de interés económico, así como por su efecto positivo sobre el crecimiento y la resistencia de las plantas (2, 3, 4, 5).

De igual modo, se trabaja en la investigación de nuevos antimicrobianos en base a productos derivados del metabolismo de las plantas como aceites esenciales, compuestos generalmente identificados como terpenos, terpenoides y fenilpropanos (6, 7, 8). Los aceites esenciales son empleados en la industria farmacéutica y cosmética, y en la actualidad han ganado importancia en el control de plagas de las plantas (9).

La combinación de agentes de control biológico microbiano con otros componentes químicos, con el propósito de aumentar la efectividad frente a fitopatógenos, es una opción en el manejo de plagas que recientemente ha generado gran interés (10). La aplicación práctica combinada debe estar precedida de estudios acerca de la interacción de estos posibles ingredientes activos con los de controles biológicos que se aplican en la agricultura. Por ello, resulta importante determinar las posibilidades de utilizar conjuntamente los aceites esenciales con controles biológicos microbianos, considerando las potencialidades mostradas por estas sustancias naturales para el desarrollo de nuevos productos comerciales.

El objetivo de este estudio fue determinar la compatibilidad de cuatro cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels con los aceites esenciales de *Piper aduncum* subsp. *ossanum* (C. DC.) Saralegui (platanillo de Cuba), *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake (melaleuca) y *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (naranja dulce).

Los aceites empleados en el estudio provinieron del Laboratorio de Productos Naturales del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). El aceite de naranja se obtuvo por expresión, y los de melaleuca y platanillo por hidrodestilación con equipo Clevenger durante tres horas, según lo establecido en la norma ISO 65-71: 84 (11). Cada esencia se secó sobre sulfato de sodio anhidro (Fluka, PA) y se almacenó a 8°C, hasta su uso, en los ensayos correspondientes.

Se trabajó con cuatro cepas de *T. asperellum* (T.1, T.13, T.78 y T.90), procedentes del laboratorio de Micología Vegetal del CENSA. Los aislamientos puros del hongo, se sembraron previamente en placas Petri de 9 cm de diámetro contentivas de Agar Malta (Biocen) y se incubaron en oscuridad por 36 h a 28°C±2°C, hasta que la colonia alcanzó las 3/4 partes del diámetro de la placa. El efecto de los aceites se evaluó por contacto directo con los hongos. Se utilizaron placas Petri

de 9 cm de diámetro contentivas de Papa Dextrosa Agar (PDA) (Biocen), y se colocaron 4 discos dobles de papel de filtro (Whatman N° 1) estériles de 6 mm de diámetro, equidistantes en cada una de las placas, y a cada uno se añadieron 10 µl del aceite correspondiente. Posteriormente se colocaron discos de 4 mm de diámetro de los aislados del antagonista, sobre los discos de papel previamente inoculados con los aceites, procurando el contacto directo del micelio del hongo con el aceite. Las placas con los discos se incubaron en oscuridad a 28°C±2°C. Se realizaron 3 réplicas por tratamiento (aceites) y se incluyó un testigo procesado de igual manera, pero los discos de papel de filtro se inocularon con agua destilada estéril. La evaluación del crecimiento radial se realizó a las 72 horas posteriores a la inoculación de los aislamientos de *T. asperellum*.

La inhibición del crecimiento micelial del antagonista se determinó, empleando la fórmula de Abbott (12).

$$PICR (\%) = [(RC - RT) / RC] \times 100$$

PICR es porcentaje de inhibición del crecimiento radial.

RT: Crecimiento radial del hongo en cada tratamiento (aceites) (mm).

RC: Crecimiento radial del hongo en el testigo (con agua destilada) (mm).

Los valores obtenidos del PICR, se sometieron a un análisis de Varianza (ANOVA) de clasificación simple y las medias se compararon según la Dócima de Rangos Múltiples de Duncan para p<0.05, con el paquete estadístico INFOSTAT Profesional ver. 2.1 (13).

En la Figura 1, se muestra el comportamiento diferencial de cuatro cepas de *T. asperellum* frente a tres aceites esenciales. El aceite de *C. sinensis* no mostró efecto inhibitorio sobre el crecimiento de ninguno de los aislamientos; así como tampoco ocasionó variaciones en aspectos culturales (textura y color) de las colonias de las cepas evaluadas de *T. asperellum*, evidenciándose así compatibilidad entre este aceite y dichos antagonistas. Los aceites esenciales de *P. aduncum* subsp. *ossanum* y *M. quinquenervia*, con el volumen evaluado, produjeron inhibición del crecimiento de los aislamientos T.1, T.78 y T.90 de *T. asperellum* entre 88 y 100%, no obstante estadísticamente no existen diferencias en el efecto de estos aceites, cuando se analizan por aislamiento. En el caso del aislado T.13 la inhibición fue total, evidenciando ser el más susceptible a estos aceites.

Resultan escasos los informes relacionados con la compatibilidad de aceites esenciales y *Trichoderma* spp. como agente de control biológico. Resultados si-

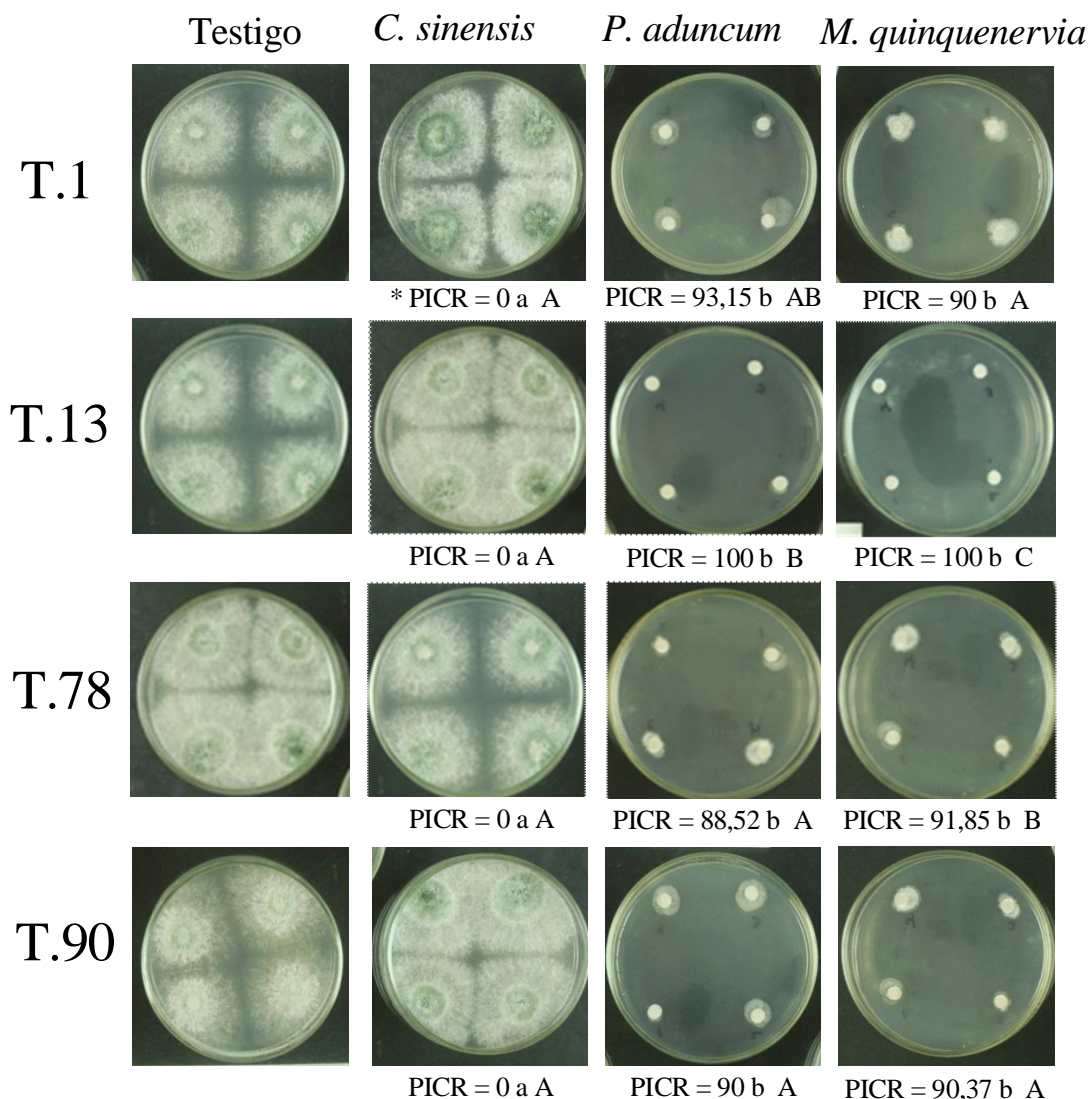


FIGURA 1. Comportamiento de las cepas (T. 1, T.13, T.78 y T. 90) de *T. asperellum* frente a los aceites esenciales./ Behavior of strains T.1, T.13, T. 78 and T.90 of *T. asperellum* in the presence of essential oils.

*PICR con letras diferentes (minúsculas) para una misma cepa difieren significativamente ($p \leq 0,05$).

*PICR con letras diferentes (mayúsculas) para un mismo aceite difieren significativamente ($p \leq 0,05$)

milares a los obtenidos en este estudio con *M. quinquenervia* y *P. aduncum* subsp. *ossanum* se informaron para los aceites de *Leptospermum scoparium* var. *scoparium* (Manuka) (14), *Pelargonum graveolens* (geranio) y *Thymus vulgaris* (tomillo) (15) que inhibieron el crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai.

La diferencia en la susceptibilidad de estas cepas de *Trichoderma* (Figura 1), reafirma una vez más la variabilidad intraespecífica de estas, evidenciado previamente, en relación a su acción como control biológico de fitopatógenos (16).

El efecto inhibitorio de un aceite esencial puede variar entre especies del mismo género. Estudios previos sobre la interacción de la esencia de *Aloysia triphylla* L'Herit (hierba luisa) con diferentes especies de *Trichoderma* evidenciaron que fue incompatible con *Trichoderma reesei* Rifai y compatible con *Trichoderma viride* Pers ex S. F Gray.(17).

Los mecanismos involucrados en la inhibición de los microorganismos por los aceites esenciales y sus componentes parecen ser múltiples. Se plantea que en el efecto inhibitorio se involucran compuestos

fenólicos; pues estos sensibilizan la bicapa fosfolípida de la membrana citoplasmática, causando un incremento en la permeabilidad y la no disponibilidad de constituyentes intracelulares vitales. En la actualidad, se demostró que el efecto antimicrobiano de los constituyentes de los aceites esenciales depende de su hidrofobicidad y partición en la membrana plasmática microbiana, entre otros. Esto está estrechamente relacionado con la adición de iones específicos en o sobre la membrana, que tiene un efecto marcado, sobre el movimiento de los protones, el contenido de ATP intracelular y toda la actividad de la célula microbiana, incluyendo el transporte de soluto y la regulación del metabolismo (10).

Los resultados obtenidos mostraron que el aceite esencial de *C. sinensis* es compatible con las cepas T.1, T.13, T.78 y T.90 de *T. asperellum* e indican que podrá ser utilizado simultáneamente con estos agentes de control biológico, para el manejo de plagas en cultivos de importancia económica. Los aceites de *P. aduncum* subsp. *ossanum* y *M. quinquevervia* fueron no compatibles al volumen evaluado con las cepas de *T. asperellum* utilizadas, por ello se recomienda, evaluar el efecto de cantidades menores y profundizar en la causa de la actividad antifúngica evidenciada, así como en la identificación de los sitios de acción (18). En cuanto a su posible utilización práctica se podrá valorar la aplicación de ambos tratamientos secuencialmente y no de forma simultánea. Por otra parte, considerando que algunos biotipos (*Th2* y *Th4*) de *T. harzianum* (19) son patógenos en cultivos de champiñones, se podría explorar el uso de estas esencias como antimicrobianos para estos casos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre compatibilidad de aceites esenciales con cepas de *T. asperellum*, son los primeros informados para el país, aspecto que reviste gran importancia para ser integrados en un programa de manejo ecológico.

REFERENCIAS

- Vázquez L. Manejo de plagas en la agricultura ecológica. Boletín Fitosanitario. 2010;15(1):115. ISSN:1816-8604.
- Kullnig C, Mach RL, Lorito M, Kubicek CP. Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (*T.harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma* ech42 gene expression before mycoparasitic contact. Appl Environ Microbiology. 2000;66:2232-2234.
- Tondje PR, Roberts DP, Bon MC, Widner T, Samuels GL, Ismaiel A, et al. Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in cameroon. Biological Control. 2007;43:202-212.
- Woo SI, Scala F, Ruocco M, Lorito M. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi and plants. Phytopathol. 2006;96:181-185.
- Martínez B, Infante D, Reyes Y. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev Protección Veg. 2013;28(1):1-11.
- Bienvenu-Magloire Q. Tropical flower and fragrance plants agribusiness as income building power for an African community. Part I Introduction to the essential oils industry and trade. AFRICABIZ. 2003; Marz/Abr; 1(47).
- Isman MB. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu Rev Entomol. 2006;51:45-66.
- Ortuño SMF. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Ediciones Aiyane. 2006: 276.
- Gómez M. Aceites esenciales contra hongos fitopatógenos. Disponible en: http://www.andaluciainvestiga.com/español/revista/revista_2004.asp. [Consultado: 10 de octubre 2011].
- Mohamed Abdel-Kader M, El-Mougy NS, Mohamed LS. Essential oils and *Trichoderma harzianum* as an integrated control measure against faba bean root rot pathogens. J of Plant Protection Res. 2011;51(3):306-313.
- International Standardization Organization. ISO 65-71. Spices, condiments and herbs. Determination of volatile oil content. 1984. (Norma ISO).
- Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J Econ Entomol. 1925;18:264-267.
- Di Rienzo J, Balzarini M, González L, Tablada M, Guzmán W, Robledo C, et al. InfoStat Profesional versión 2.1. Universidad Nacional de Córdoba.

- Argentina. 2009. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>.
14. Górski R, Sobieralski K, Siwulski M, Góra K. Effect of selected natural essential oils on *in vitro* development of fungus *Trichoderma harzianum* found in common mushroom (*Agaricus bisporus*) cultivation. *Ecological Chemistry and Engineering*. 2010;17(2):177-184.
 15. Górski R, Frużyńska-Józwiak D, Andrzejak R. Wpływ naturalnych olejków eterycznych na rozwój *in vitro* grzyba *Trichoderma harzianum* występującego w uprawie pieczarki dwuzarodnikowej (*Agaricus bisporus*) [The effect of natural essential oils on *in vitro* development of a fungus *Trichoderma harzianum* found in garden mushroom *Agaricus bisporus* crops]. *Zesz Probl Post Nauk Roln*. 2008;529:19-26.
 16. Infante D, González N, Reyes Y, Martínez B. Evaluación de la efectividad de doce cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels sobre tres fitopatógenos en condiciones de campo. *Rev Protección Veg*. 2011;26(3):194-197.
 17. Hanaa FM, Hossam S. El-Beltagi, Nasr F N. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Aloysia triphylla*. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 2011;10(8):2689-2699.
 18. Pawar VC, Thaker VS. Evaluation of the anti-*Fusarium oxysporum* f. sp *cicer* and anti-*Alternaria porri* effects of some essential oils. *World J Microbiol Biotechnol*. 2007;23:1099-1106.
 19. Hermosa MR, Grondona I, Iturriaga EA, Diaz-Minguez JM, Castro C, Monte E, *et al*. Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(5):1890-1898.

Recibido: 20-11-2012.

Aceptado: 3-2-2013.