

COMUNICACIÓN CORTA

Efecto *in vitro* de componentes de aceites esenciales sobre *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Goddard) Zare & Gams y *Lecanicillium lecanii* (Zim.) Zare & Gams

Yaíma Sánchez Pérez, Miriam M. Rojas, Jersys Arévalo Ortega, Oriela Pino Pérez

Departamento de Plagas Agrícolas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque. Cuba. Teléfono: 47863014 ext-180. Correo electrónico: ysanchez@censa.edu.cu.

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto *in vitro* de componentes de aceites esenciales como alcanfor, canfeno, piperitona y safrol sobre los hongos controles biológicos: *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Goddard) Zare & Gams y *Lecanicillium lecanii* (Zim.) Zare & Gams. Para el estudio se utilizó el método de las diluciones seriadas en medio líquido y se emplearon concentraciones de 1,25; 2,5 y 5 mg.ml⁻¹ de las sustancias químicas. El alcanfor y el canfeno no fueron tóxicos a los hongos en el rango de concentraciones evaluado. Se pueden usar piperitona y safrol a concentraciones inferiores a 2,5 mg.ml⁻¹ para *L. lecanii* y menores o igual a 5 mg.ml⁻¹ para *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, o aplicarse en momentos diferentes del tratamiento.

Palabras clave: alcanfor, canfeno, piperitona, safrol, *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*, *Lecanicillium lecanii*.

***In vitro* effect of components of essential oils against *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Goddard) Zare & Gams and *Lecanicillium lecanii* (Zim.) Zare & Gams**

ABSTRACT: The aim of this study was to determine the *in vitro* effect of components of essential oils such as camphor, camphene, piperitone and safrole against the fungal biological control agents *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Goddard) Zare & Gams and *Lecanicillium lecanii* (Zim.) Zare & Gams. The study was carried out using the method of serial dilutions in liquid medium, and concentrations of 1.25, 2.5 and 5 mg.ml⁻¹ of the chemicals were used. Camphor and camphene were not toxic to fungi in the evaluated range of concentrations. Piperitone and safrole can be used at concentrations lower than 2.5 mg.ml⁻¹ for *L. lecanii* and lower than or at 5 mg.ml⁻¹ for *P. chlamydosporia* var. *catenulata* or applied at different times of treatment.

Key words: camphor, camphene, piperitone, safrole, *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*, *Lecanicillium lecanii*.

Cuba trabaja en desarrollar un modelo de agricultura sostenible donde los medios biológicos y, en menor extensión los plaguicidas botánicos, desempeñan un rol determinante para alcanzar producciones agrícolas con buenos rendimientos y el empleo mínimo de compuestos agrotóxicos (1, 2). En el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) se trabaja intensamente en la búsqueda de nuevas alternativas para el control de plagas, entre las que se destacan los agentes de control biológico y los productos naturales basados en aceites esenciales y sus componentes.

Los hongos *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Goddard) Zare & Gams y *Lecanicillium lecanii* (Zim.) Zare & Gams se estudiaron como parásito facultativo de huevos de nematodos formadores de agallas y para el control de insectos plagas, respectivamente. *P. chlamydosporia* var. *catenulata* (cepa IMI SD 187) es el principio activo del producto comercial denominado KlamiC®, producido en la Unidad de Investigación y Desarrollo de Hongos Agentes de Control Biológico del CENSA, con buenos resultados para el manejo de poblaciones de *Meloidogyne* spp. que afectan los culti-

vos de tomate, pepino, pimiento, zanahoria, remolacha y lechuga (3, 4). *L. lecanii* es un biorregulador natural de plagas de importancia económica como son la mosca blanca, los pulgones, los trips y la roya del café; también se considera una alternativa para el manejo de estos grupos en cultivos como el tomate, la soya, las cucurbitáceas, la fruta bomba, los cítricos, la col, el café y el tabaco (5).

En muchos casos, estos agentes de control biológico pueden asociarse con algunos productos naturales para incrementar la eficiencia del control; de este modo disminuye la cantidad requerida de producto y se minimizan los riesgos de contaminación ambiental y la expresión de resistencia de la plaga (6). Entre los posibles productos naturales que pueden ser utilizados en asociación se encuentran los aceites esenciales y sus componentes, pues se demostró su toxicidad sobre nematodos y un amplio rango de insectos plagas (7); además de ser excelentes herramientas en el manejo integrado de plagas que se emplean en rotación con productos con diferentes modos de acción (7, 8).

El uso conjunto de estas alternativas permite el manejo de más de una plaga en un cultivo o de diferentes estados de desarrollo de una misma plaga. Sin embargo, muchos componentes de aceites esenciales inhiben el crecimiento de varios hongos (9-11), por lo que es necesario evaluar el efecto de estos sobre los controles biológicos para lograr la inserción exitosa del uso conjunto de estas alternativas en los diferentes programas de manejo integrado de plagas. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto *in vitro* del alcanfor, canfeno, piperitona y safrol sobre *P. chlamydosporia* var. *catenulata* y *L. lecanii*.

Los componentes de aceites esenciales: canfeno, alcanfor, piperitona y safrol -calidad puro para análisis- se adquirieron en Sigma-Aldrich®. Se utilizaron los hongos controles biológicos *P. chlamydosporia* var. *catenulata* (cepa IMI SD 187) y *L. lecanii* (cepa VI-01), pertenecientes a los ceparios de la Planta Piloto y del Laboratorio de Micología Vegetal del CENSA, respectivamente. Los hongos se sembraron en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) (BioCen) y se incubaron a 25 °C durante 72 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, se prepararon suspensiones microbianas con aproximadamente 10^5 esporas.ml⁻¹ (conidios + clamidosporas) de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* y 10^7 conidios.ml⁻¹ de *L. lecanii*.

La prueba del efecto *in vitro* se realizó por el método de las diluciones seriadas (12), adaptado según el siguiente procedimiento: el experimento se realizó en tubos de ensayo y se utilizó medio líquido caldo Triptona

Soya (TSC). Se estudiaron tres concentraciones de los componentes de aceites esenciales: 1,25; 2,5 y 5 mg.ml⁻¹, previamente disueltos en acetona (p.a., Merck) y tween 20 (p.a., Merck) a 10 mg.ml⁻¹ de concentración final de cada uno. Los tubos se inocularon con las suspensiones microbianas; la concentración final en cada tubo fue, aproximadamente, 3×10^4 esporas.ml⁻¹ de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* y 2×10^6 conidios.ml⁻¹ de *L. lecanii*. Cada prueba se realizó por triplicado y se incluyeron controles de crecimiento. La temperatura de incubación fue de 25°C y el tiempo de 72 horas. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se determinó, como el primer tubo, en orden ascendente de concentraciones, en el cual no se observó crecimiento de los hongos.

El establecimiento de la Concentración Mínima Fungicida (CMF) se realizó removiendo 20 µl de cada tubo donde no se observó crecimiento y se inoculó en placas de medio Agar Papa Dextrosa (PDA). La CMF se determinó como la concentración capaz de inhibir totalmente el crecimiento de los hongos.

En el rango de concentraciones evaluado, el alcanfor y el canfeno no fueron tóxicos a *P. chlamydosporia* var. *catenulata* y *L. lecanii*. A pesar de que la CMI es la misma para los dos agentes de control biológico, cuando se utiliza piperitona y safrol existen diferencias entre ellos, pues *L. lecanii* es más susceptible, con valores de CMF de 2,5 mg.ml⁻¹ para ambos componentes. El safrol ocasionó la mayor inhibición del crecimiento de ambos microorganismos (Tabla 1), por lo que su introducción en programas de manejo integrado en que se utilicen estos agentes de control biológico debe ser estudiada más cuidadosamente.

Las diferencias encontradas pueden estar relacionadas con la naturaleza química de estas sustancias. El canfeno y el alcanfor son monoterpenos bicíclicos; la piperitona es una cetona monoterpénica monocíclica y el safrol un fenilpropanoide oxigenado. Por ejemplo, se comprobó para el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. que monoterpenos oxigenados, como el carvacrol y el timol, no inhiben la germinación de conidios y si se usa cimeno (monoterpeno) a bajas concentraciones, es posible estimular su germinación (13). Además de las diferencias en las estructuras moleculares, las concentraciones de los componentes o las características del microorganismo podrían incidir en los efectos que estos compuestos tienen sobre el control biológico.

Castellanos *et al.* (5), al evaluar la compatibilidad de plaguicidas químicos sintéticos con *L. lecanii* (cepa Y-57) a una concentración de 2 mg.ml⁻¹, observaron que dicofol (Dicofol CE 18.5) provocó mayor inhibición

TABLA 1. Efecto *in vitro* de componentes de aceites esenciales sobre *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* y *Lecanicillium lecanii*./ *In vitro* effect of essential oil components against *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* and *Lecanicillium lecanii*

Tratamiento	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i>		<i>Lecanicillium lecanii</i>	
	CMI (mg.ml ⁻¹)	CMF (mg.ml ⁻¹)	CMI (mg.ml ⁻¹)	CMF (mg.ml ⁻¹)
alcanfor	> 5	> 5	> 5	> 5
canfeno	> 5	> 5	> 5	> 5
piperitona	2,5	> 5	2,5	2,5
safrol	≤ 1,25	> 5	≤ 1,25	2,5

^{CMI} Concentración Mínima Inhibitoria en caldo Triptona Soya, ^{CMF} Concentración Mínima Fungicida en Agar Papa Dextrosa (25°C y 72 horas de incubación).

del crecimiento microbiano y se clasificó como muy tóxico. Imidacloprid (Relevo PH 70) y abamectina (Abamectina CE 1.8) también inhibieron considerablemente el crecimiento del hongo, en el orden de 50 y 60%, respectivamente, pero se consideraron compatibles al tener en cuenta su efecto sobre la esporulación y metamorfosis (Amidor CS 60), fue moderadamente tóxico, con una menor inhibición de esta cepa de *L. lecanii*. La inhibición del crecimiento microbiano no es el único factor a evaluar para determinar la compatibilidad entre diferentes alternativas de control, sino que el efecto sobre la capacidad esporulativa juega un papel determinante; por tanto, en estudios posteriores se deberá contemplar el efecto sobre este parámetro de los componentes de aceites estudiados.

En el caso de *P. chlamydosporia* (cepa IMI SD 187), los insecticidas λ -cihalotrina (Karate CE 5,0) y cipermetrina (Cipermetrina CE 10), en concentraciones incluidas dentro del rango investigado en este estudio, inhibieron el crecimiento micelial del control biológico y fueron compatibles; mientras que el bioestimulante vegetal Biobras-16 fue considerado muy tóxico y, sin embargo, potenció el crecimiento radial del hongo (14). No obstante, el hecho de que las concentraciones de alcanfor y canfeno con efecto inhibitorio de *L. lecanii* y *P. chlamydosporia* sean superiores a 5 mg.ml⁻¹, aumenta sus posibilidades de ser compatibles con estos agentes microbianos.

Los estudios del efecto de aceites esenciales o sus componentes sobre agentes de control biológico son bien limitados y no se encontraron antecedentes sobre la compatibilidad de componentes de aceites esenciales con los hongos descritos. Estos resultados brindan información sobre las posibles concentraciones a utilizar en los programas de manejo integrado de nematodos e insectos plagas, combinados con los agentes de control biológico *P. chlamydosporia* var.

catenulata y *L. lecanii*. Las investigaciones posteriores deben completar los estudios de compatibilidad y evaluar estas combinaciones sobre las plagas a nivel de laboratorio, en casas de cristal y en campo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer la colaboración de los técnicos Cecil González y Nerdy Acosta en la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Figueroa ZIG, Pérez-Consuegra N. Tendencias en el uso de plaguicidas en el municipio Colón, provincia Matanzas. Agricultura Orgánica. 2012;18(2):10-14.
2. Vázquez LLM. Transición del manejo de plagas en la producción agropecuaria en Cuba. Agricultura Orgánica. 2012;18(2):21-25.
3. Arévalo J, Silva SD, Carneiro MDG, Lopes RB, Carneiro RMDG, Tigano MS, et al. Efecto de la presencia de abono orgánico sobre la actividad de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y Gams frente a *Meloidogyne enterolobii* Yang y Eisenback. Rev Protección Veg. 2012;27(3):167-173.
4. Ceiro WG, Arévalo J, Puertas AL, Hidalgo-Díaz L. Efecto de concentraciones de NaCl sobre el crecimiento micelial y la esporulación de *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams en medio PDA y suelo. Rev Protección Veg. 2014;29(2):122-127.

5. Castellanos González L, Lorenzo Nicao ME, Muiño BL. Compatibilidad de cuatro plaguicidas de diferentes grupos químicos con *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & Gams. Rev Protección Veg. 2013;28(3):199-203.
6. Islam MT, Omar DB. Combined effect of *Beauveria bassiana* with neem on virulence of insect in case of two application approaches. J Anim Plant Sci. 2012;22(1):77-82.
7. Isman MB, Miresmailli S, Machial C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. Phytochem Rev. 2010;10(2):197-204.
8. Mohan M, Haider SZ, Andola HC, Purohit VK. Essential oils as green pesticides: for sustainable agriculture. Res J Pharm Biol Chem Sci. 2011;2(4):100-106.
9. Kordali S, Cakir A, Ozer H, Cakmakci R, Kesdek M, Mete E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. Bioresource Technol. 2008;99(18):8788-8795.
10. Ozcan MM, Chalchat J-C. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. Int J Food Sci Nutr. 2008;59(7-8):691-698.
11. Pandey R, Sikora RA. Influence of aqueous extracts of organic matter on the sensibility of *Heterodera schachtii* Schmidt and *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood eggs to *Verticillium chlamydosporium* Goddard infection. Z Pflanzenkr Pflanzenschutz. 2010;107(5):494-497.
12. Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition: American Society of Microbiology; 2015.
13. Liu W. Compatibility of essential oils with the biocontrol fungus, *Beauveria bassiana*. Master's Thesis, University of Tennessee. 2012.
14. Ceiro WG, Arévalo J, Hidalgo-Díaz L. Efectos de plaguicidas y bioestimulantes vegetales sobre la germinación de clamidosporas y el desarrollo in vitro del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. Rev Iberoam Micol. 2015;32(4):277-280.

Recibido: 15-12-2015.
Aceptado: 11-3-2016.