

EVALUACIÓN TOXICA DE ACEITES ESENCIALES CONTRA *Diaphorina citri* Y SU COMPATIBILIDAD CON *Metarhizium anisopliae*

Villegas-Mendoza Jesús Manuel, Alba-Moreno Isela Madai, Rosas-García Ninfa María, Mireles-Martínez Maribel, Rivera-Sánchez Gildardo y Paz-Gonzalez Alma Delia. Centro de Biotecnología Genómica Instituto Politécnico Nacional. Blvd. Del Maestro S/N esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza. C.P. 88710. Cd. Reynosa Tamaulipas, México. jmvillegas@ipn.mx.

RESUMEN: Los resultados de compatibilidad mostraron que las conidias de *Metarhizium anisopliae* son capaces de germinar hasta en un 97% en presencia de los aceites esenciales de ajo, ciprés eucalipto, limón, naranja y menta, mientras que clavo, canela y geranio ejercieron un efecto inhibitorio. Los datos de evaluación tóxica muestran que el aceite esencial de ciprés fue el que mostro más del 50 % de mortalidad en *Diaphorina citri* por lo cual puede ser considerado para el desarrollo de formulaciones bioecológicas.

Palabras clave: Aceites esenciales, *Diaphorina citri*, *Metarhizium anisopliae*, biorracionales.

Toxic evaluation of essential oils on *Diaphorina citri* and compatibility with *Metarhizium anisopliae*

ABSTRACT: Compatibility results showed that *Metarhizium anisopliae* conidia are able to germinate up to 97% in the presence of the essential oils of garlic, cypress eucalyptus, lemon, orange and mint, while cloves, cinnamon and geranium exerted an inhibitory effect. Toxic evaluation showed that essential oil of cypress showed higher mortality on *Diaphorina citri*, therefore we suggest that could be used in the development of biorational formulations.

Key words: Oil essential, *Diaphorina citri*, *Metarhizium anisopliae*, biorational.

Introducción

El Estado de Tamaulipas es considerado una de las entidades federativas más importantes en la producción de cítricos, en el 2012 SIAP, registró una superficie de 3,696.29 Ha de limón, 32,193.19Ha de naranja y 3,929.68 Ha de mandarina, propensas al ataque del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), este insecto es vector de la bacteria Gram negativa: *Candidatus Liberibacter* spp., asociada a la enfermedad denominada como Likubin, citrus greening o enverdecimiento, pero recientemente se ha llamado Huanglongbing (HLB): enfermedad del dragón amarillo (Luke *et al.*, 2005; Robles-González *et al.*, 2010). Distribuido en todas las áreas citrícolas del país (SENSASICA, 2013). *D. citri* muestra una clara preferencia por las hojas jóvenes, las ninfas y el adultos se alimentan al succionar la savia de los brotes vegetativos tiernos, dejando manchas cloróticas en las hojas (Bonani, 2009). Actualmente se realiza diferentes estrategias de control del insecto como es el químico con Cipermetrina, Aldicarb, Dimetoato y Clorpirifos, control biológico con los hongos: *Hirsutella citrififormis* Speare y *B.bassiana*, *Paecilomyces* sp y *Metarhizium anisopliae* spp. (Arredondo-Bernal *et al.*, 2010) mostrando niveles de mortalidad más del 50 % (Sánchez-Peña, 2011) y el uso de Biorracionales con compuestos naturales como la azadiractina que causa mortalidades del más del 70 % en ninfas (Sandoval Rincón, 2010) y otros productos que contienen aceites de canela, tomillo, clavo, critonela, menta, ajo u eucalipto mostrando mortalidades de más del 30 % en ninfas (Fontes-Puebla *et al.*, 2010). El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar el efecto toxico de varios aceites

esenciales contra *Diaphorina citri* y su compatibilidad con la cepa *Metarhizium anisopliae* spp., para el diseño de un insecticida biorracional para el control del psílido asiático de los cítricos.

Materiales y Método

Compatibilidad de aceites esenciales con la cepa Ma 57. Se evaluaron 10 aceites esenciales a dos concentraciones 5 μ L y 10 μ L y un testigo absoluto. Cada aceite esencial se colocó en 20 ml de caldo dextrosa sabouraud ajustado con Tween 80[®] 0.05%, cada tratamiento consistió cinco repeticiones. Posteriormente cada tratamiento se inoculó con 3.0×10^6 conidias/ml y se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación a 150 rpm durante 12 h. Posteriormente cada tubo se sometió a un spin en el agitador mecánico y se determinó el porcentaje de germinación de las conidias utilizando una cámara de Neubauer.

Manejo de insectos adultos de *Diaphorina citri*: Para realizar el bioensayo los insectos fueron enfriados durante 6 min a 4°C para adormecerlos y permitir su manejo, posteriormente se colocaron en toallas de papel estériles (Hoy *et al.*, 2010). Y se rociaron con los tratamientos correspondientes. En seguida, los insectos se transfirieron con un pincel de pelo de camello, en grupos de 10 a una rama turgente de naranjo (*Citrus sinensis*) colocada dentro de un vaso de plástico (SOLO[®]) (30 ml) con 7 g de hidrogel (Water gems[®]) como hidratante y una tapa de papel para evitar el contacto directo del insecto con el hidrogel. Todos los vasos se cubrieron con “tela de tul” (15 x 17 cm), sujeta con ligas de hule para garantizar la aireación (Morales *et al.*, 2010).

Bioensayos de toxicidad de aceite esenciales: Se realizó mediante la inoculación directa de 30 adultos de *D. citri* con 5 repeticiones. Se utilizó un control negativo que solo tenía una suspensión en Tween[®] 80 al 0.05% y 6 aceites esenciales que fueron compatibles con el hongo: ajo, ciprés, eucalipto, limón, menta y naranja, ajustados a una concentración de 1 ml/l.

Los datos del porcentaje de mortalidad obtenidos fueron transformados en arco seno y se realizó un ANOVA y una comparación múltiples Tukey ($P < 0.05$) utilizando el paquete estadístico SPSS (Versión 15).

Resultado y Discusiones

Los análisis estadísticos indican alta diferencia significativa en los tratamientos de 5 μ l/ml ($F = 856.24$, $gl = 54$, $P < 0.00$), agrupando al ajo, ciprés, eucalipto, limón, menta, naranja y absoluto y los diferentes al testigo absoluto son: canela, clavo, geranio y lavandín (Cuadro 1). Para los tratamientos de 10 μ l/ml, se muestra un alta diferencia significativa entre los tratamientos ($F = 973.10$, $gl = 54$, $P < 0.00$), agrupando al ajo, ciprés, eucalipto, limón, naranja y testigo absoluto como iguales pero diferente a canela, clavo, geranio, menta piperita y lavandín.

Los resultados mostraron que las conidias son capaces de germinar hasta en un 97% en presencia de los aceites esenciales de ajo, ciprés eucalipto, limón, naranja y menta. Sin embargo, los aceites esenciales de clavo, canela y geranio ejercieron un efecto negativo en la germinación de las conidias, causando una inhibición del crecimiento del alrededor del 97%. Los aceites de lavandín y de menta causaron un efecto asociado a la concentración, es decir, a la concentración baja permitieron la germinación en un 85 y 90% respectivamente, pero a la concentración alta inhibieron el crecimiento en un 99%.

Los bioensayos de toxicidad demostraron que el aceite de ciprés causó la mayor mortalidad (55.9%), el resto de los aceites evaluados causaron una mortalidad por debajo del 32% en comparación con el testigo absoluto 9.33%, Los resultados coinciden con los de Tapondjou *et al.*, (2005), quienes

utilizaron el aceite de ciprés para el control de *Sitophilus zeamais* y *Tribolium confusum* con buenos resultados de actividad insecticida y de repelencia.

En el cuadro 2 se muestra que el ciprés causó una mayor efecto tóxico a los adultos de *D. citri* con un $55.99 \pm 3.48\%$ de mortalidad, también se obtuvieron 3 niveles de significancia de los 7 tratamientos, con una diferencia significativa del ($F = 14.33$, $gl = 34$, $P < 0.00$).

Cuadro 1.- Compatibilidad de aceites esenciales con conidias de *Metarhizium anisopliae* cepa Ma 56.

| Aceites esenciales | Porcentaje de germinación a las 12 h Media \pm EE* | |
|---|--|--------------------|
| | en 5 μ L/ml | en 10 μ L/ml |
| Ajo (<i>Allium sativum</i>) | 97.20 \pm 0.86d | 98.0 \pm 0.31b |
| Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>) | 1.60 \pm 1.6b | 1.80 \pm 0.91a |
| Ciprés(<i>Cupressus sempervirens</i>) | 96.40 \pm 0.50d | 99.60 \pm 0.44c |
| Clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>) | 1.00 \pm 0.31a | 0.60 \pm 0.67a |
| Eucalipto (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>) | 97.04 \pm 0.50d | 98.00 \pm 0.31b |
| Geranio (<i>Pelargonium crispum</i>) | 3.80 \pm 0.80ab | 1.40 \pm 0.40a |
| Lavandín (<i>Lavandula hybrida</i>) | 78.41 \pm 2.43c | 2.40 \pm 0.67a |
| Limón (<i>Citrus limonum</i>) | 99.60 \pm 0.24e | 99.40 \pm 0.24bc |
| Menta piperita (<i>Mentha sativa</i>) | 97.30 \pm 0.24de | 2.60 \pm 1.24a |
| Naranja (<i>Citrus sinensis</i>) | 97.60 \pm 0.40d | 97.40 \pm 0.67bc |
| Testigo absoluto† | 98.60 \pm 0.24de | 98.60 \pm 0.24bc |

Cuadro 2.Mortalidad causada por aceites esenciales en adultos hacia *D. citri*.

| TRATAMIENTOS | MEDIA \pm EE |
|---|--------------------|
| Ajo (<i>Allium sativum</i>) | 27.32 \pm 2.01b |
| Ciprés(<i>Cupressus sempervirens</i>) | 55.99 \pm 3.48c |
| Eucalipto (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>) | 15.29 \pm 4.24ab |
| Limón (<i>Citrus limonum</i>) | 31.33 \pm 1.79b |
| Menta piperita (<i>Mentha sativa</i>) | 31.87 \pm 0.71b |
| Naranja (<i>Citrus sinensis</i>) | 21.86 \pm 2.12ab |
| Testigo absoluto | 9.33 \pm 2.16a |

Conclusiones

Los aceites esenciales ajo, ciprés, eucalipto, limón, naranja permiten la germinación de las cepa de *M. anisopliae*, y pueden ser utilizados como agentes activos de formulaciones biológicas como adyuvantes que permiten incrementar la mortalidad hacia insectos. Por otra parte el aceite esencial de ciprés fue el que mostro mayor mortalidad en *Diaphorina citri* y puede ser utilizado en formulaciones biorracionales contra el Psílido Asiático de los cítricos en combinación con la cepa Ma 57 *M. anisopliae*.

Agradecimientos

Fondos Mixtos Tamaulipas por el soporte financiero así a la SIP-IPN y COFFA.

Literatura Citada

- Arredondo, B., H.C., Sánchez-González, J.A., Merlín-Rosas, M.A. 2010. Avances en el control biológico del psílido asiático de los cítricos en México. VI Simposio Internacional Citrícola, Tecoman, Colima. 4-6 de Noviembre.
- Bonani, J. P. 2009. Caracterização do aparelho bucal e comportamento alimentar de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.
- Fontes, P. A. A., Fu, C. A. A., López, A. J. I., Verdugo, Z. W., Pacheco, C. J. J. (2011). Control de *Diaphorina citri*, insecto vector de la enfermedad Huanglongbing (HLB), en huertos de cítricos orgánicos. INIFAP-CIRNO-CECH. Desp. Téc. 24. Hermosillo, Son. Méx.
- Hoy, M. A., Singh, R., Rogers, M.E. 2010. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). Florida Entomologist 93(1):24-32.
- Luke, S., Cioffi-Revilla, C., Panait, L., and Sullivan, K. (2005). MASON: A Java Multi-Agent Simulation Environment. Simulation: Transactions of the Society for Modeling and Simulation International 81 (7):517--527.
- Morales P., Fonseca, O., Noguera, Y., Cabaña, W., Ramos, F., Escalona, E., Rosales, C., Cermeli, M., Salas, B., Sandoval, E. 2010. Life cycle assessment of Asiatic citrus psyllid five hosts plants. Agronomía Trop 60(3): 283-286.
- Robles-González, M.M. 2010. Bioecología del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en limón mexicano en Colima.