

USO DE ACEITES ESENCIALES COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO EN EL CONTROL DE *Sphaeropsis sapinea*.

Iturritxa, E.; Gonzalez de Murillo, M.; Muruamendiaraz, A.; Ortiz-Barredo, A. eiturritxa@neiker.net
NEIKER. Granja Modelo – Arkaute. Apdo. 46. 01080 Vitoria-Gasteiz

Resumen

Uno de los retos englobados en el ámbito de la sostenibilidad forestal es la consecución de estrategias de control que minimicen el impacto en el ecosistema. Con el objetivo de potenciar el uso de sustancias naturales, inocuas para el medio ambiente, se realiza un estudio de diversos aceites esenciales, en relación a su efectividad como agentes de control del hongo patógeno *Sphaeropsis sapinea*. Las sustancias sometidas a estudio proceden de diferentes partes de la planta (hojas, flores, ramas) y proceden de las especies vegetales *Thimus vulgaris*, *Melaleuca alterniflora*, *Cupresus sempervirens*, *Melaleuca quinquenervia*, *Citrus limonum*, *Lavandula officinalis*, *Thimus zizis*, que se corresponden respectivamente con los siguientes compuestos bioquímicos: 1pineno cimol borneol, 4 terpineol, geraniol Esteres, 1,8 cineol, viridiflorol, citrales, acetato de linalino y timol.

Siendo *Thimus vulgaris*, *Melaleuca alterniflora* y *Lavandula officinalis* los que presentan una bioactividad fuerte en orden decreciente. La mínima concentración con acción fungicida de los aceites esenciales fue el aceite diluido al 10 %. para tomillo *Thimus vulgaris* (1pineno cimol borneol) seguido de *Melaleuca alterniflora* (4 terpineol) y *Lavandula officinalis* (acetato de linalino).

Palabras clave: *Melaleuca*, *Thimus*, sustancias naturales, funguicidas

INTRODUCCIÓN

Pinus radiata D. Don, es una especie inicialmente introducida en España como ornamental y actualmente expandida como forestal en áreas de influencia cantábrica, delimitada climáticamente por la ausencia de heladas. La gran adaptabilidad que demuestra la especie ante ambientes diversos y su alta productividad en condiciones medias hacen de esta conífera un recurso económico de alto interés.

Sin embargo, la creciente incidencia de patologías, especialmente las ocasionadas por el hongo *Sphaeropsis sapinea*, está condicionando su sostenibilidad dentro del ámbito forestal. Teniendo en cuenta el impacto económico y social que supondría un rápido declive sectorial, unido a las restricciones marcadas por las normativas europeas en materia de aplicación de productos fitosanitarios, en el área forestal, se hacen necesarios métodos de control, dentro de la filosofía de la “lucha integrada” y, en los casos más drásticos, alternativas que eviten o minimicen los riesgos y pérdidas de renta del sector.

(Mesa Arango et al., 2004) denominadas AEBBD, Aceites esenciales Botánica y Bioquímicamente definido (Laboratorio PhytoSumAroms) obtenidas por el método de destilación por arrastre de vapor de agua. Mediante este sistema, el aceite esencial queda flotando en superficie y el hidrolato aromático en la parte inferior, separándose por decantación. Se definen bioquímicamente, mediante la técnica combinada de Cromatografía de gases-Espectrofotometría de masas (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003). En este trabajo se estudia la actividad fungitóxica de los componentes de algunos de estos aceites, con la previsión de ir incorporando nuevas sustancias a las posibilidades de aplicación de funguicidas en el entorno forestal.

MATERIAL Y METODOS

Aislado fúngico utilizado en el test.

La cepa de *Sphaeropsis sapinea* utilizada en este estudio fue aislada de un brote, con síntomas de afección por dicho hongo, procedente de un árbol en una plantación de *Pinus radiata* localizada en Respalditza (Alava) correspondiente al morfotipo A

Definición de la sustancia disolvente.

Debido a la característica de insolubilidad en agua de los aceites en estudio, las diluciones se realizaron en aceite de almendras dulces, (*Prunus amygdalus* GUINAMA), una vez comprobada su actividad completamente inocua en el crecimiento del hongo sobre PDA (Patata Dextrosa Agar, 4 g por l, glucosa 20 g por l, agar 15 g por l (Oxoid, Unipath Ltd., Bedford, UK).

Sustancias analizadas.

En la tabla 1 se muestra el origen de los aceites esenciales, especie botánica, origen, especificidad bioquímica y diluciones ensayadas, esquema del proceso de destilación.

Estudio de la Fungitoxicidad de los componentes *in vitro*.

Para testar el modo directo de acción de los aceites esenciales sobre el micelio, se lleva a cabo el método descrito a continuación.

Se cultiva el aislado de *Sphaeropsis sapinea* sobre placas de PDA, a las que, previamente, se les han añadido cada uno de los tratamientos en estudio, aceites esenciales a diferentes dosis. Los aceites esenciales utilizados en este ensayo, proceden de las especies vegetales *Thimus vulgaris*, *Melaleuca alterniflora*, *Cupressus sempervirens*, *Melaleuca quinquenervia*, *Citrus limonum*, *Lavandula officinalis* y *Thimus zizis*, que se corresponden respectivamente con los siguientes compuestos bioquímicos: 1pineno cimol borneol, 4 terpineol, geraniol Esteres, 1.8 cineol, viridiflorol, citrales, acetato de linalino y timol (AEBBD, Aceites esenciales Botánica y Bioquímicamente definidos del Laboratorio PhytoSumAroms). Las series de diluciones analizadas fueron 0%, control de la actividad óptima del aislado, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % 100 %. Los aceites esenciales fueron diluidos en aceite de sésamo, *Prunus amygdalus*, (Casa comercial GUINAMA, de densidad 0,911 a 25°C) debido a que dichas sustancias no son solubles en agua y el aceite de sésamo no ejerce ninguna influencia en el desarrollo del hongo, (los resultados obtenidos al cultivar el hongo con este aceite añadido fueron idénticos al control sobre PDA, sin aceite vegetal. Todos los componentes fueron incorporados sobre el medio una vez autoclavado y solidificado, directamente sobre la placa de agar.(Palazón y Palazón, 1985; Gea et al., 2003) Se utilizaron placas de 12 pocillos de 2 cm de diámetro. Para cada dilución de aceite esencial ensayada se inoculan 6 pocillos de 6 ml con fragmentos de micelio procedentes de los márgenes exteriores de micelio, activamente creciendo en PDA. Tras un periodo de incubación de 15 días a 22°C en la oscuridad, se mide el diámetro de las colonias y se determina el área de crecimiento. En aquellos casos en los que la colonia presentaba un crecimiento limitado a unos pocos milímetros (< 5 mm), o no se producía crecimiento alguno, se comprueba la viabilidad del hongo cultivándolo de nuevo sobre placa de PDA sin aceites esenciales añadidos, de esta manera se comprueba el efecto fungicida o fungiestático de las sustancias en estudio (Pilotti et al., 2004).

RESULTADOS

Se realiza un análisis de varianza , aplicando el modelo GLM factorial simple sobre la variable área de crecimiento de *Sphaeropsis sapinea*, considerando como factores fijos las diferentes concentraciones de las sustancias sometidas a estudio, mostrando un rango continuo de variación, dependiendo de la sustancia y la concentración. Como era de esperar, en aquellas sustancias con actividad fungicida, dicha actividad mantiene una relación directa con la concentración de la sustancia, a excepción del aceite esencial de *Citrus limonum*, (limoneno) en el cual se produce el fenómeno contrario, se produce un incremento en el área de crecimiento del hongo del 22,76% superior al control, al exponerse el hongo a una dilución del 50 % y de un 34,6 % a una dilución del 25 % , se observa una activación del crecimiento del hongo superior a la que se produce en el control. Los aceites esenciales obtenidos a partir de las especies vegetales, *Thimus vulgaris*, *Melaleuca alterniflora* y *Lavandula officinalis* , presentan una bioactividad fuerte en orden decreciente.

La mínima concentración con acción fungicida de los aceites esenciales fue el aceite diluida al 10 % para tomillo *Thimus vulgaris*, obtenido a partir de flores, cuyas materias activas son el 1pineno, cimol y borneol, seguido de *Melaleuca alterniflora*, obtenida de la hoja de esta planta, con 4 terpineol como materia activa y *Lavandula officinalis*, extraída de flores, cuya sustancia activa es el acetato de linalino

Los resultados obtenidos con las sustancias y diluciones ensayadas se muestran en la Tabla 2 y Figura 1

En cuanto a la actividad fungicida o fungiestática, los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 3 .

BIBLIOGRAFÍA

GEA, F.J.; LAINEZ, C. y NAVARRO, M.J.; 2003. Caracterización y sensibilidad *in vitro* a los fungicidas benomilo y procloraz de aislados de *Trichoderma* procedentes del cultivo de champiñón. Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas, 29: 143-148, 2003.

MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO; .2003. Real Farmacopea Española. Suplemento 2.2. Segunda

edición. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid 2003

MESA ARANGO, A.C; BUENO SÁNCHEZ, J.G. y BETANCUR GALVIS; 2004. Productos naturales con actividad antimicótica. Revista Española Quimioterapia, Diciembre 2004; Vol.17 (Nº 4): 325-331. 2004 Prous Science, S.A.-Sociedad Española de Quimioterapia.

PALAZÓN I.J. y PALAZÓN, C.F., 1985. Ensayo de funguicidas in vitro.

2º Curso Internacional sobre la protección fitosanitaria en plantaciones frutales de clima templado.

PILOTTI, M.; FESTA, S.; GERVASI, F.& COPPOLA, R.; 2004. Biological assays to study induction of resistance in *Platanus x Acerifolia* to *Caratocystis fimbriata*. Journal of Plant Pathology (2004), 86 (1), 71-83.

Tabla 1 Origen de los aceites esenciales: especie botánica, origen, especificidad bioquímica y diluciones ensayadas. Esquema del proceso de destilación.

Especie Botánica	Organo Productor	Especificidad bioquímica	Diluciones 0-10-25-50-75-100
<i>Thymus vulgaris</i>	Flores	l-pineno, cimol	
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Hoja	4-terpineol	
<i>Cyperus sempervirens</i>	Ramas	Geraniol, Esteres	
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Hoja	1,8 cineol, viridiflorol	
<i>Citrus limonum</i>	Cascara	Limoneno, citrales	
<i>Lavandula officinalis</i>	Flores	Acetato de linalilo	

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: CTO

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	13594,660(a)	40	339,867	100,365	,000
Intersección	17325,183	1	17325,183	5116,259	,000
Tratamientos	13594,660	40	339,867	100,365	,000
Error	694,191	205	3,386		
Total	31614,035	246			
Total corregida	14288,852	245			

a R cuadrado = ,951 (R cuadrado corregida = ,942)

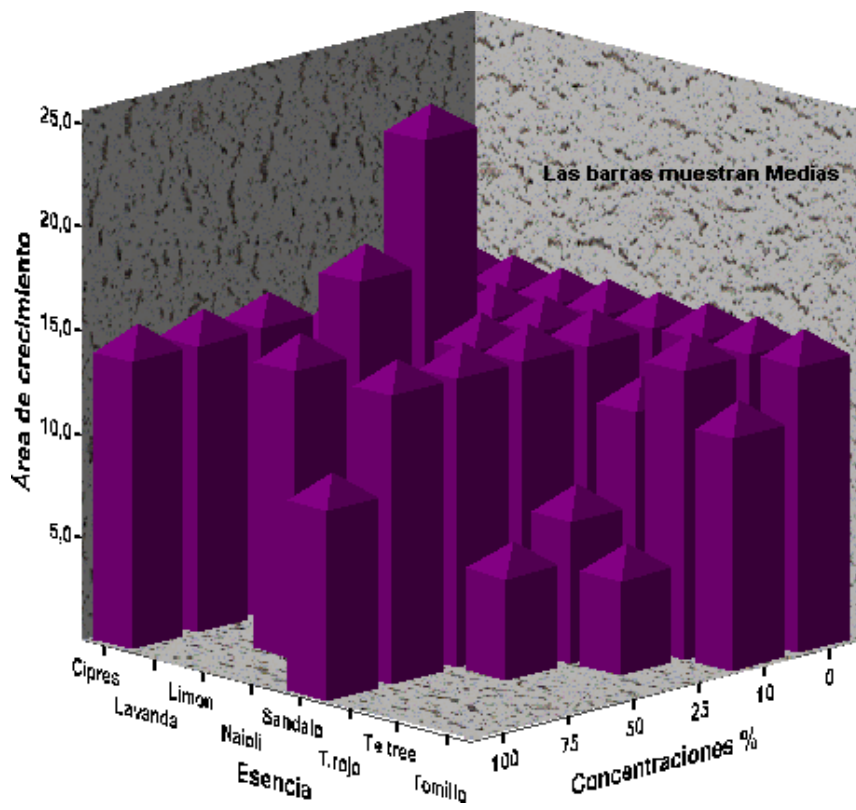


Figura 1. Media del área de crecimiento del aislado *Sphaeropsis sapinea*, al ser expuesto a los diversos tratamientos ensayados (sustancias y concentraciones)

Area de Crecimiento en medio agarizado PDA

Tratamientos	Subconjuntos Waller-Duncan							
	a	b	c	d	e	f	g	h
La100%	,0000							
La50%	,0000							
La75%	,0000							
Li100%	,0000							
Na100%	,0000							
Na50%	,0000							
Na75%	,0000							
T100%	,0000							
T25%	,0000							
T50%	,0000							
T75%	,0000							
TR100%	,0000							
TR75%	,0000							
TT100%	,0000							
TT50%	,0000							
TT75%	,0000							
La25%		5,2450						
TT25%		5,8600						
TR50%		6,1767						
TR25%			8,1333					
Sa100%				10,5017				
Ci10%				11,4800	11,4800			
T10%					12,5600			
TR10%					12,5600			
C						15,2000		
Ci100%						15,2000		
Ci25%						15,2000		
Ci50%						15,2000		
Ci75%						15,2000		
Li10%						15,2000		
Li75%						15,2000		
Na10%						15,2000		
Na25%						15,2000		
Sa10%						15,2000		
Sa25%						15,2000		
Sa50%						15,2000		
Sa75%						15,2000		
TT10%						15,2000		
La10%						15,4233		
Li50%							18,6600	
Li25 %								24,6767

Tabla 2. Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos. Basado en la suma de cuadrados tipo III El término error es la Media cuadrática (Error) = 3,386. a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000 b Razón de seriedad del error de tipo 1/tipo 2 = 100

Esencia	50%(SS)	75%(SS)	100%(SS)
Tomillo	fungiestatico	fungicida	fungicida
Tomillo rojo	fungiestatico	80%fungicida-20%fungiestatico	fungicida
Lavanda	fungiestatico	fungiestatico	fungiestatico
Naioli		fungiestatico	fungiestatico
Te Tree	fungiestatico	fungicida	fungicida

Tabla 3. Definición de la actividad fungicida o fungiestática en los tratamientos ensayados que

manifestaron una inhibición del crecimiento micelia