

# EFFECTIVIDAD *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CRISANTEMO Y DE HONGOS ACAROPATÓGENOS EN EL CONTROL DEL ÁCARO ROJO DE LAS PALMERAS

Carlos Vásquez<sup>1</sup>, Paula Velandia<sup>2</sup>, María A. Jiménez<sup>2</sup>, Pilar Pazmiño<sup>1</sup>,  
Giovanny Velastegui<sup>1</sup> y Cristian Pérez-Salinas<sup>3</sup>

## RESUMEN

El ácaro rojo de las palmeras, *Raoiella indica*, es considerado una plaga de importancia económica en plantaciones de coco (*Cocos nucifera* L.); sin embargo, existe poca información disponible sobre las estrategias de control ecológicamente sustentables. En este estudio, se evaluó la efectividad *in vitro* del extracto etanólico (EE) de crisantemo (*Chrysanthemum cinerariifolium*) y su compatibilidad con los hongos acaropatógenos (*Isaria fumosorosea* y *Beauveria bassiana*) sobre el control de *R. indica*. En el laboratorio, los ácaros fueron reproducidos en unidades de cría usando discos de hoja de coco cultivar Enano Amarillo Malayo. Se demostró el efecto sobre la mortalidad de huevos, larvas y adultos del ácaro por la acción sola y combinada del EE (0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,5; 5, 10 y 15 %) y las especies de hongo. Aunque el EE usado a 0,25 y 05% inhibió el crecimiento micelial de *I. fumosorosea* y *B. bassiana*, también promovió la producción de conidios de ambos hongos. El uso solo o combinado de los tratamientos no mostró diferencias en la mortalidad producida sobre huevos, larvas y adultos de *R. indica*; sin embargo, el EE parece ejercer un efecto ligeramente mayor sobre el ácaro.

**Palabras clave adicionales:** Coco, manejo sustentable, *Raoiella indica*

## ABSTRACT

**Effectiveness *in vitro* of ethanolic extract from chrysanthemum and acaropathogen fungi in controlling the red palm mite**  
Red palm mite, *Raoiella indica*, is considered an economic important pest in coconut plants (*Cocos nucifera* L.); however, information about ecologically sustainable strategies of control is still scarce. In this study, *in vitro* effectiveness of ethanolic extract (EE) of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariifolium*) and compatibility with acaropathogenic fungi (*Isaria fumosorosea* and *Beauveria bassiana*) on *R. indica* control were evaluated. In the laboratory, mites were reared in rearing units using coconut leaf discs cv. Malayan Yellow Dwarf. Mortality of eggs, larva and adult mite by single and combined application of EE (0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.5, 5, 10 and 15 %) and fungus species was demonstrated. Although the EE at 0.25 and 0.5 % inhibited the mycelial growth of *I. fumosorosea* and *B. bassiana*, conidial production was also promoted in both fungi species. Single or combined use of treatments did not show differences in egg, larvae or adult mite's mortality; however, the EE seems to provoke a slightly higher effect on the mite.

**Additional key words:** Coconut, *Raoiella indica*, sustainable management

## INTRODUCCIÓN

El ácaro rojo de las palmeras, *Raoiella indica* Hirst, es una plaga introducida en la región del Caribe desde el 2004 (Flechtmann y Etienne, 2004). Posteriormente se distribuyó ampliamente en la mayoría de las islas en esta región

(Flechtmann y Etienne, 2005; Etienne y Flechtmann, 2006; Rodrigues et al., 2007), en Florida (Peña et al., 2006) y más recientemente en México (NAPPO 2009), Venezuela (Vásquez et al., 2008), Brasil (Návia et al., 2011) y Colombia (Carrillo et al., 2011).

Desde su introducción, *R. indica* se ha

<sup>1</sup> Recibido: Julio 27, 2017

Aceptado: Febrero 16, 2018

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Campus Querochaca, Universidad Técnica de Ambato. Provincia de Tungurahua, Ecuador. e-mail: ca.vasquez@uta.edu.ec

<sup>2</sup> Dpto. Ciencias Biológicas, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela. e-mail: majimenez@ucla.edu.ve

<sup>3</sup> Facultad de Ingeniería Civil y Mecánica, Campus Huachi, Universidad Técnica de Ambato. Provincia de Tungurahua, Ecuador.

convertido en plaga de importancia económica en coco, donde el daño por alimentación se manifiesta principalmente en las hojas maduras, las cuales se tornan amarillentas y pueden llegar a secarse completamente (Rodrigues et al., 2007). Aparte del daño observado en plantaciones naturales y comerciales de coco, esta especie constituye una plaga potencial en Musáceas, Strelitziáceas y Zingiberáceas (Vásquez y Moraes, 2013).

El control de *R. indica* ha estado basado en el uso de productos químicos, pero su alto costo y la dificultad de aplicación por la altura de las palmeras ha llevado a buscar alternativas ecológicamente sustentables. En tal sentido, el uso de hongos patógenos constituye una estrategia viable para el control de ácaros e insectos plaga (Charnley y Collins, 2007). Las esporas de estos hongos entomopatógenos se adhieren y germinan en la cutícula del artrópodo atraviesan el exoesqueleto o pared del aparato digestivo de los insectos, invaden el cuerpo del huésped, provocando su muerte (Vilcinskas y Götz, 1999; Charnley y Collins, 2007). Entre las especies de hongos acaropatógenos más utilizadas debido a su amplia distribución y su inocuidad al ambiente se incluyen *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) y *Beauveria* spp. (Carrillo y Blanco, 2009).

Estudios histopatológicos realizados por Zhang et al. (2014) permitieron detectar la adhesión y germinación de los conidios de *B. bassiana* e *I. fumosorosea* sobre huevos de *Tetranychus urticae* Koch a las 24 h después de la aplicación. De acuerdo con estos autores, el tubo germinal de *B. bassiana* se elongó hasta encontrar un sitio adecuado para la penetración, mientras que el tubo germinal de *I. fumosorosea* puede embeberse a lo largo de una extensión considerable sobre el huevo. Shi y Feng (2004) observaron un efecto ovicida de aislados obtenidos a partir de estos hongos y sugirieron su uso como agentes biocontrol contra *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). Así mismo, Vásquez et al. (2017) detectaron un control del 72 % al utilizar *Cladosporium* sp. vs. *T. urticae*.

Por otra parte, la utilización de extractos vegetales ha mostrado una tendencia usada en el manejo de plagas como alternativa al uso indiscriminado de agroquímicos (Scalvenzi et al., 2016; Vásquez et al., 2016). Estudios previos han

demostrado que el extracto obtenido a partir de flores de *C. cinerariifolium* a concentraciones de 40, 30 y 20 % provocó 100, 77 y 66 % de mortalidad en *Tribolium castanum*, respectivamente (Shawkat et al., 2011). De manera similar, Haouas et al., (2008) observaron que el EE de flores de diferentes especies de *Chrysanthemum* causaron alta tasa de mortalidad en *T. confusum* y postularon que posiblemente estos extractos provocaban un efecto en el crecimiento de los insectos. Pavela (2009) observó que la aplicación de extracto de crisantemo al 0,5 % produjo mortalidad superior al 70 % en poblaciones de *T. urticae*. Las piretrinas, obtenidas a partir de *Chrysanthemum* son ésteres formados por la combinación de los ácidos crisantémico y pirétrico y los alcoholes piretrolona, cinerolona y jasmolona. Estos compuestos atacan el sistema nervioso central y periférico, lo que ocasiona descargas repetidas, seguidas de convulsiones. Estos compuestos taponan las entradas de los iones de sodio a los canales, lo que genera que dichos canales sean afectados al alterarse la conductividad del ión en tránsito. La característica más importante de estos compuestos es su efecto de hiperexcitabilidad al entrar en contacto con la superficie tratada, el artrópodo deje de alimentarse y muere (Silva et al., 2002; Klaassen y Watkins, 2003).

En tal sentido, el extracto de *Chrysanthemum* spp. constituye una alternativa para el control de diferentes tipos de artrópodos plaga, cuyo principio activo actúa por contacto y tiene un efecto paralizante sobre la plaga (Mamun y Ahmed, 2011). Tomando en consideración lo antes expuesto, en el presente trabajo se evaluó la efectividad *in vitro* del EE de crisantemo y de hongos acaropatógenos como alternativa para el manejo de *R. indica*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue conducido en el Laboratorio de Fundamentos Fitopatológicos del Posgrado de Fitopatología, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Venezuela y tanto las cepas de los hongos acaropatógenos como el extracto etanólico (EE) de crisantemo (pirenatur) fueron suministradas por la empresa Insubiol.

**Colecta, mantenimiento y determinación del**

**ácaro *R. indica*.** Los ensayos fueron iniciados con poblaciones de *R. indica* colectados sobre plantas de coco en Cabudare, estado Lara. Las muestras de hoja con síntomas de ataques por este ácaro fueron colocadas en bolsas plásticas de cierre hermético, internamente recubiertas con papel absorbente. Las muestras fueron llevadas al Insectario del Posgrado de Agronomía de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”.

Para la obtención de una cohorte de edad homogénea, los ácaros fueron reproducidos en unidades de cría colocadas a  $27 \pm 1$  °C,  $47 \pm 10$  % HR, 12 h diarias de luz. Cada unidad consistió de una lámina de poliuretano ( $100 \text{ cm}^2$ ) donde fueron colocados cuatro discos de hoja (3 cm de diámetro) de coco cultivar Enano Amarillo Malayo con la superficie abaxial expuesta hacia arriba. Cada disco de hoja fue bordeado con una banda de algodón humedecida con agua destilada para evitar el escape de los ácaros y mantener la turgencia de la hoja. Diariamente, tanto el poliuretano como la banda de algodón fueron saturados con agua destilada.

Para la obtención de los huevos, en cada disco de hoja fueron colocadas 30 hembras y machos adultos de *R. indica* para promover la oviposición hasta obtener el número suficiente de huevos para obtener la población inicial. Posteriormente, las hembras y machos fueron descartados para luego iniciar el ensayo de efectividad del EE y los hongos acaropatógenos.

**Efecto del extracto etanólico de *C. cinerariifolium* sobre *R. indica*.** Para evaluar este efecto se prepararon concentraciones de 0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,5; 5; 10 y 15 % a partir de una solución madre del EE al 100 % usando agua destilada esterilizada como diluyente. Se usaron discos de hoja tratados con etanol al 95 % como testigo. Seguidamente, los discos fueron sumergidos durante 20 seg en la concentración del extracto correspondiente y dejados a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) durante 30 min. Una vez secos, se colocaron sobre los discos 10 hembras de 1-2 días de edad seleccionadas al azar de la cría de laboratorio previamente descrita. Cada tratamiento fue repetido cuatro veces. Se evaluó la mortalidad del ácaro a las 24 y 48 h después de la aplicación del extracto, considerando una hembra muerta cuando no respondió al toque de un pincel fino.

**Compatibilidad de *I. fumosorosea* y *B. bassiana***

**con el extracto etanólico de *C. cinerariifolium*.**

La compatibilidad entre los hongos y el EE fue evaluada *in vitro* mediante el estimado de la inhibición del crecimiento y de la esporulación, siguiendo el método de discos de papel filtro en cápsulas de Petri. Se preparó una suspensión de conidios de cada hongo ( $10^3$  conidios·mL<sup>-1</sup>) tomando un disco proveniente de un cultivo en agar papa dextrosa (PDA) que contenía la respectiva especie de hongo crecido durante 5 días. Los discos fueron colocados en 10 mL de agua destilada estéril. A partir de esta suspensión conidial, se tomaron alícuotas de 50 µL con la ayuda de una micropipeta y se distribuyó uniformemente con un rastrillo esterilizado sobre el medio de cultivo. Seguidamente, sobre cada placa fueron colocados cuatro discos de papel de filtro estériles (5 mm de diámetro) sobre los cuales se aplicaron 10 µL del EE a las concentraciones de 0,25 y 0,50 %. El testigo consistió en discos de papel impregnados con etanol al 95 %. La prueba se repitió cuatro veces.

Para evaluar el efecto del EE sobre la inhibición del crecimiento del hongo, las placas fueron incubadas bajo condiciones de laboratorio ( $27 \pm 2$  °C) durante 48 h, y seguidamente se observó el diámetro del halo de inhibición alrededor de cada disco, siguiendo la metodología de Reyes et al. (2012).

Para evaluar el efecto sobre la capacidad del hongo para formar esporas (conidiogénesis), se tomó un disco de 5 mm de diámetro del hongo por placa y se colocó en 10 mL de agua destilada estéril que contenía Tween al 0,01 % para promover la emulsificación. Se agitó la suspensión por 60 seg y seguidamente fue contabilizado el número de conidios·mL<sup>-1</sup> para estimar la inhibición de la esporulación.

Los valores obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza y prueba de medias de Tukey usando el programa Statistix versión 8.0.

**Efecto de la aplicación individual y combinada de *I. fumosorosea* y el extracto etanólico de *C. cinerariifolium* sobre huevos y larvas de *R. indica*.** La patogenicidad se evaluó usando la técnica de inmersión de discos de hoja (Vásquez y Ceballos, 2009). Los discos de hoja (6 cm de diámetro) que contenían huevos recién puestos fueron sumergidos en una suspensión del hongo a una concentración de  $10^8$  conidios·mL<sup>-1</sup> durante 40 seg. Seguidamente los discos de hoja fueron

secados a temperatura ambiente y posteriormente asperjados con la dosis menor (0,25 %) del EE. Estos discos fueron secados a temperatura ambiente y finalmente colocados sobre las arenas de cría. Los tratamientos fueron: T1=*I. fumosorosea* +huevos, T2=EE +huevos, T3=*I. fumosorosea* +EE +huevos, y T0=testigo.

Diariamente se observó el efecto de los tratamientos sobre los huevos y sobre la emergencia de las larvas. Los datos fueron expresados como porcentaje de mortalidad de huevos + larvas.

**Efecto de la aplicación individual y combinada de *I. fumosorosea* y el extracto etanólico de *C. cinerariifolium* sobre adultos de *R. indica*.** Se colocaron 10 ácaros adultos sobre los discos de hoja en las unidades de cría, las cuales fueron mantenidas a  $27 \pm 2$  °C y fotoperíodo de 12 h de luz. El EE se utilizó al 0,25 %. Los tratamientos considerados fueron: T1 = *I. fumosorosea* +EE +adultos, T2 = *B. bassiana* +EE +adultos, T3=*I. fumosorosea* +*B. bassiana* +EE + adultos, y T0=testigo. Cada tratamiento fue repetido cuatro veces. Los datos fueron expresados como porcentaje de mortalidad en adultos a las 48 h después de la aplicación.

Los ensayos fueron conducidos en un diseño completamente al azar. Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza y prueba de Tukey usando el programa Statistix versión 8.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Toxicidad del extracto etanólico de *C. cinerariifolium* sobre *R. indica*.** Se observó un efecto sobre la tasa de mortalidad de *R. indica* con el uso de EE de *C. cinerariifolium* en comparación al tratamiento control (Cuadro 1). A las 24 h después de la aplicación, la mortalidad de los ácaros fue de 70 % o menos al usar las concentraciones más bajas del EE, pero alcanzó el 80 % o más a partir del EE al 1 %. A las 48 h después de la aplicación del extracto en su más baja concentración (0,25 %) se alcanzaron tasas de mortalidad superiores al 80 %. El efecto de las diferentes dosis generó las siguientes ecuaciones de regresión:

$$y (24 \text{ h}) = 0,180 x + 7,68, R^2=0,55, P \leq 0,03$$

$$y (48 \text{ h}) = 0,097 X + 8,92, R^2=0,47, P \leq 0,06$$

El efecto pesticida de diferentes EE ha sido

demostrado en diferentes especies de ácaros fitófagos. El aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake provocó mortalidad en hembras de *T. urticae*, *Panonychus citri* y *R. indica* (100 %) y *Tetranychus tumidus* Banks (88,73 %) (Pino et al., 2011). Fernández et al. (2016), demostraron que el EE de *Cymbopogon citratus* (D.L.) Stapf al 7,5 % produjo la mayor mortalidad (92,5 %) y reducción de la oviposición (100 %) de *R. indica*. Por otra parte, El-Sharasaby (2010) demostró que el EE de *Artemisia judaica* L. resultó tener mayor efecto tóxico y repelente sobre las hembras de *T. urticae*, comparado con los extractos acetónicos, de éter de petróleo y acuoso. Sin embargo, después de las 48 h, los ácaros sobrevivientes comenzaron a alimentarse, indicando que, después de este lapso, el compuesto orgánico que había causado la repelencia aparentemente había perdido acción.

Contrariamente, en el presente estudio se observó que el extracto de crisantemo además de causar un efecto de repelencia, evidenciado con la cantidad de ácaros que intentaron escapar de las arenas de cría, provocó un efecto tóxico dado el número de ácaros muertos observados 24 y 48 h después de la aplicación. Estudios previos han señalado que los EE presentan efectos múltiples sobre artrópodos como inhibición de la alimentación, repelencia, disminución de la oviposición, interrupción del desarrollo de la ecdisis y reducción de la fertilidad, fecundidad y mortalidad (Martínez, 2002).

**Cuadro 1.** Mortalidad acumulada de hembras de *R. indica* a las 24 y 48 h después de la aplicación del extracto etanólico de *C. cinerariifolium*

Dosis (%)	Número de ácaros muertos (basado en 10 ácaros por unidad de cría)	
	24 h	48 h
0	2,25 b	3,75 b
0,25	7 a	8,5 a
0,5	6,5 a	8,25 a
1,0	8 a	8,75 a
1,5	8,25 a	9,25 a
2,0	9,75 a	10 a
5,0	8,5 a	10 a
10,0	9,75 a	10 a
15,0	10 a	10 a

Valores seguidos de la misma no mostraron diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

Basados en los presentes resultados, la evaluación de compuestos vegetales biológicamente activos podría proveer nuevas alternativas para el desarrollo de acaricidas naturales que puedan ser incluidas como estrategias dentro de un programa de manejo integrado de ácaros plaga de modo de producir el menor daño al ambiente.

**Compatibilidad *in vitro* de *I. fumosorosea* y *B. bassiana* con el extracto etanólico de *C. cinerariifolium*.** Los resultados mostraron que la aplicación de dosis de 0,5 % del EE de crisantemo provocó un incremento del halo de inhibición de 3,18 veces sobre *I. fumosorosea*, mientras que en *B. bassiana* el aumento fue 2,27 veces cuando fueron comparados con el testigo (valores calculados a partir de los datos del Cuadro 2).

Por otra parte, aunque la aplicación del extracto vegetal produjo un efecto negativo sobre el crecimiento micelial de las especies de hongo, contrario a lo esperado, se observó un estímulo en la esporulación de ambas especies estudiadas cuando se les comparó con el testigo. En *I. fumosorosea*, el número de esporas incrementó de 74.000 en el testigo hasta 283.500 cuando fue tratado con la dosis del extracto de 0,5 % (Cuadro 2), lo que representó un incremento de 3,83 veces sobre el testigo. En *B. bassiana* el estímulo de la

conidiogénesis fue aun mayor, alcanzándose aumentos de 2,97 y 4,53 veces a las dosis de 0,25 y 0,5 %, respectivamente. La inhibición observada en crecimiento micelial podría estar relacionado al efecto de las piretrinas presentes en el EE de crisantemo (Marcano y Hasegawa 2002). Contrariamente, el incremento en la esporulación podría ser debida a una estimulación causada por efecto de dosis bajas de un factor de estrés como resultado de la inducción directa o una sobre-compensación por alteración de la homeostasis en un proceso biológico (Flores y Garzón, 2013).

Mamprim et al. (2014) señalaron que los extractos al 10 % de diversas especies vegetales mostraron compatibilidad con el hongo entomopatógeno *B. bassiana*, mientras que el extracto de ruda (*Ruta graveolens* L.) provocó reducción tanto en el diámetro como en la producción de conidios del hongo. Adicionalmente estos autores observaron que el EE de *C. citratus* provocó aumento en la producción de conidios, lo que pudiera estar relacionado con la capacidad de degradación y metabolización del principio activo por parte del hongo, que así son utilizados como nutrientes secundarios, promoviendo su crecimiento vegetativo y la conidiogénesis.

**Cuadro 2.** Efecto *in vitro* de diferentes dosis del extracto etanólico de *C. cinerariifolium* sobre la inhibición del crecimiento (halo de inhibición) y de la esporulación (número de conidios) de *I. fumosorosea* y *B. bassiana* el quinto día de la evaluación ( $\bar{X} \pm SD$ )

Dosis (%)	<i>I. fumosorosea</i>		<i>B. bassiana</i>	
	Halo de inhibición (mm)	Número de conidios/mL	Halo de inhibición (mm)	Número de conidios/mL
0	2,75 ± 1,89	74.000 ± 57.250	3,67 ± 0,058	74.000 ± 38.030
0,25	8,00 ± 3,56	126.500 ± 88.090	8,00 ± 0,356	219.500 ± 163.560
0,5	8,75 ± 2,50	283.500 ± 119.400	8,33 ± 0,353	335.000 ± 81.410

Por su parte, el EE de orégano (*Lippia oreganoides*) al 0,37 % mostró compatibilidad con el hongo biocontrolador *T. harzianum*, evidenciado por un mayor crecimiento micelial; no obstante, se observaron modificaciones morfológicas de la colonia del hongo y un crecimiento aéreo con apariencia algodonosa (Alvarado et al., 2011). Estos resultados coinciden parcialmente con los de Depieri et al. (2005) quienes demostraron la compatibilidad *in vitro* de extractos de las hojas de nim (*Azadirachta indica*)

con *B. bassiana*, en cuanto a su crecimiento micelial, producción y viabilidad de los conidios en concentraciones de 0,5; 1 y 1,5 %. De manera similar a lo observado en el presente estudio, Urdaneta et al. (2013) encontraron un incremento en el efecto estimulante del EE de *Gliricidia sepium* Kunth ex Steud. sobre *Colletotrichum acutatum* Simmonds manifestado por el incremento en la severidad producida por el hongo a bajas concentraciones del extracto. Contrario a los resultados obtenidos en el presente estudio,

Rushda et al. (2011) encontraron que el máximo número de conidios·cm<sup>-2</sup> fue observado en el tratamiento control (34,4·10<sup>6</sup>), cifra que disminuyó progresivamente cuando fueron tratados con extractos de *Veronica anagallis aquatica*, *Lantana camara*, *Amaranthus spinosus*, *Solanum nigrum* y *Gnaphalium purpureum*.

**Efecto de la aplicación individual y combinada de *I. fumosorosea* y el extracto etanólico de *C. cinerariifolium* sobre huevos y larvas de *R. indica*.** Se observó un efecto de la aplicación sola o combinada del EE de crisantemo e *I. fumosorosea* sobre la mortalidad en huevos y larvas de *R. indica* cuando fueron comparados con el tratamiento control; sin embargo, no se observaron diferencias entre ellos (Cuadro 3). La mortalidad observada por la aplicación de los tratamientos fue varias veces superior al control.

La mayoría de los EE aplicados como acaricidas no son efectivos sobre los huevos por lo que se requerirán dos o más aplicaciones para lograr control de las fases inmaduras (Aceves et al., 2016). Estudios previos han demostrado resultados variables en la efectividad de estas especies de hongos sobre diferentes especies de ácaros fitófagos. Sin embargo, *I. fumosorosea* y *B. bassiana* han mostrado ser los más promisorios para controlar ácaros ya que reducen el número de adultos y huevos (van der Geest y Bruin, 2000).

Shi y Feng (2004), observaron mayor mortalidad de huevos de *T. cinnabarinus* cuando se emplearon tres aislados de estas dos especies de hongos, por lo que se requiere determinar previamente la diversidad genética y estructura poblacional para asegurar su éxito en el uso como agente de biocontrol (Gauthier et al., 2007).

**Efecto de la aplicación individual y combinada de *I. fumosorosea* y el extracto etanólico de *C. cinerariifolium* sobre adultos de *R. indica*.** Similar a lo observado con los huevos, la mortalidad de adultos de *R. indica* fue afectada por la aplicación el EE de crisantemo y de los hongos entomopatógenos en comparación con el testigo, pero no mostraron diferencias entre ellos (Cuadro 3). La mortalidad producida por los tratamientos fue varias veces superior al tratamiento control. Aunque no se encontró información donde se evaluara el efecto de ambas especies de hongos con extractos botánicos, existen varias experiencias en las que se estudió el efecto de alguna de estas especies mezclados con extractos vegetales. Así, Mohan et al. (2007) observaron que el uso combinado de *B. bassiana* y extracto de nim podría mostrar un efecto sinérgico sobre la mortalidad de *Spodoptera litura* Fabricius siempre que la cepa de hongo usada no fuera susceptible al extracto.

**Cuadro 3.** Mortalidad de huevos y larvas, y adultos de *R. indica* por la aplicación sola o combinada de *I. fumosorosea* (I) y *B. bassiana* (B) con el extracto etanólico (EE) de *C. cinerariifolium* al 0,25 % (basado en 10 ácaros por unidad de cría)

Testigo	Huevos y larvas			Testigo	Adultos		
	I	EE	I + EE		I+EE	B+EE	I+B+EE
1,75 a	6,5 b	8,0 b	6,0 b	1,75 a	7,50 b	7,75 b	6,25 b

Valores seguidos de la misma letra en cada estado de desarrollo del ácaro no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

En general, los hongos entomopatógenos, especialmente los acaropatógenos causan niveles de mortalidad superior al 80 % debido a la especificidad entre el agente de biocontrol y su hospedante y esta efectividad tiende a incrementar a medida que aumenta la concentración de las esporas (Alves et al., 2002). La variación en la virulencia de una especie de hongo podría estar relacionada al tipo de aislamiento, por ejemplo, Draganova y Simova (2010) encontraron que la mortalidad causada por *B. bassiana* sobre *T. urticae* varió de acuerdo al aislamiento utilizado y

e indicaron que la mayor velocidad de algunos aislados para producir efecto letal podría estar relacionada a la presencia de metabolitos secundarios tóxicos. Así mismo, la producción de proteasas que degradan la cutícula de los artrópodos juega un rol importante en la virulencia de las razas de hongos, como es el caso del género *Beauveria* (Delgado et al., 2001). La variación en el efecto de los diferentes hongos entomopatógenos pudiera explicar la variabilidad de los resultados encontrados en este estudio donde se combinaron los hongos.

Estudios donde se usaron hongos biocontroladores en forma combinada para el control de plagas han mostrado resultados controversiales; por un lado, reportan efecto sinérgico (Purwar y Sachan, 2006; Sabbour y Hussein, 2014), y en otros casos señalan que aunque la aplicación de dos hongos resultó en coinfección, la mortalidad no fue afectada significativamente (Cruz et al., 2006). Las consideraciones anteriores pudieran explicar la variabilidad de los resultados encontrados en nuestro estudio, y dado que la aplicación combinada de los hongos *I. fumosorosea* y *B. bassiana* sobre el ácaro adulto no presentó un efecto aditivo, se sugiere evaluar la aplicación combinada, pero no simultánea de los tratamientos como alternativa para el control del ácaro.

### CONCLUSIONES

Se demostró efecto tóxico y de repelencia del extracto etéreo de crisantemo sobre *R. indica*, siendo este efecto mayor a medida que se incrementó la concentración del extracto. Aunque éste inhibió significativamente el crecimiento micelial tanto de *I. fumosorosea* y *B. bassiana*, promovió la producción de esporas en ambas especies de hongos, haciendo que ambas estrategias sean factibles de ser usadas en combinación. El uso solo y combinado de hongos y EE no mostró diferencias en la mortalidad producida sobre huevos y larvas de *R. indica*. Sin embargo, el extracto pareciera ejercer un efecto ligeramente mayor sobre el ácaro.

Con base en los resultados obtenidos, el uso del EE junto con los hongos acaropatógenos empleados parecen ser una alternativa viable para el manejo de la población de *R. indica*.

### AGRADECIMIENTO

Al Postgrado de Fitopatología y al Centro de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado por el apoyo a esta investigación.

### LITERATURA CITADA

1. Aceves-Núñez, V.A., B. Monroy-Reyes, P. Posos-Ponce, E. Pimienta-Barrios y Posos-

Parra O.A. 2016. Efectividad biológica de kuneka (*Quassia amara* + aceite de karanja + aceite de neem) para control de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) en fresa. *Entomol. Mexicana* 3: 294-298.

2. Alvarado, S., D. Ulacio, M. Osorio, M.E. Sanabria, M.A. Jiménez. 2011. Compatibilidad *in vitro* de extractos vegetales y *Trichoderma harzianum* y su efecto en el crecimiento de *Sclerotium rolfsii* Sacc. y *Sclerotium cepivorum* Berk. *Bol. Cent. Invest. Biol.* 45 (3): 217-343.
3. Alves, S.B., L.S. Rossi, R.B. Lopes, M.A. Tamai y R.B. Pereira 2002. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *J. Invertebr. Pathol.* 81: 70-77.
4. Amaya, D., A. Barrera, A. Hilarión, A. Bustos y F. Cantor. 2008. Evaluación de la efectividad de dos hongos entomopatógenos y un extracto vegetal, para el control de *Tetranychus urticae*, en condiciones de laboratorio. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas* 4(1): 62-69.
5. Carrillo, D., D. Návía, F. Ferragut y J.E. Peña. 2011. First Report of *Raoiella indica* (Acari: Tenuipalpidae) in Colombia. *Fla. Entomol.* 94(2): 370-371.
6. Carrillo-Rayas, M. y A. Blanco-Labra. 2009. Potencial y algunos de los mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga. *Acta Univ.* 19(2): 40-49.
7. Charnley, A.K. y S.A. Collins. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. *In: C. Kubicek e I. Druzhinina* (eds.). *Environmental and Microbial Relationship. The Mycota.* Springer, Berlin. pp. 159-187.
8. Cruz, L.P., A.L. Gaitan y C.E. Gongora. 2006. Exploiting the genetic diversity of *Beauveria bassiana* for improving the biological control of the coffee berry borer through the use of strain mixtures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71(6): 918-26.
9. Delgado, F., Y. López, E. Giraldo y P. Vélez. 2001. Actividad lipolítica y proteolítica de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y su relación con la patogenicidad sobre

- Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Rev. Col. Entomol. 27(1-2): 61-65.
10. Depieri, R., S. Martínez y A. Menezes. 2005. Compatibility of the fungus *Beauveria bassiana* (Blas). Vuill (Deuteromycetes) with neem seed extract and leaves and the emulsible oil. Neotrop. Entomol. 34: 601-606.
  11. Draganova, S.A. y S.A. Simova. 2010. Susceptibility of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) to isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Pest. Phytomed. 25(1): 51-57.
  12. El-Sharabasy, H.M. 2010. Acaricidal activities of *Artemisia judaica* L. extracts against *Tetranychus urticae* Koch and its predator *Phytoseiulus persimilis* Athias Henriot (Tetranychidae: Phytoseiidae). J. Biopest. 3(2): 514-519.
  13. Etienne, J. y C.H.W. Flechtmann. 2006. First record of *Raoiella indica* (Hirst, 1924) (Acari: Tenuipalpidae) in Guadalupe and Saint Martin, West Indies. Int. J. Acarol. 32: 331-332.
  14. Fernández, O., M.F. Sandoval, M.E. Sanabria y C. Vásquez. 2016. Efectividad *in vitro* del extracto etanólico de *Cymbopogon citratus* (D.L.) Stapf y hexythiazox sobre *Raoiella indica* Hirst. Idesia 34(2): 77-84.
  15. Flechtmann, C.H.W. y J. Etienne. 2004. The red palm mite, *Raoiella indica* Hirst, a threat to palms in the Americas (Acari: Prostigmata: Tenuipalpidae). Syst. Appl. Acarol. 109-110.
  16. Flechtmann, C.H.W. y J. Etienne. 2005. Un nouvel acarien ravageur des palmiers: En Martinique, premier signalement de *Raoiella indica* pour les Caraïbes. Phytoma 548: 10-11.
  17. Flores, F.J. y C.D. Garzón. 2013. Detection and assessment of chemical hormesis on the radial growth *in vitro* of Oomycetes and fungal plant pathogens. Dose Response 11: 361-73.
  18. Gangai-Abirami, S.K. Vivekanandhan, R. Hemanthkumar, S. Prasanth y J. Ravi Kumar. 2014. Study of antimicrobial potential of *Aegle marmelos*. J. Med. Plants. Stud. 2(2): 113-6.
  19. Gauthier, N., C. Dalleau-Clouet, J. Fargues y M.C. Bom. 2007. Microsatellite variability in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*: genetic diversity and population structure. Mycologia 99(5): 693-704.
  20. Haouas, D., M. Halima-Kamel y M. Hamouda. 2008. Insecticidal activity of flower and leaf extracts from *Chrysanthemum* species against *Tribolium confusum*. Tunis. J. Plant Prot. 3(2): 87-94.
  21. Klaassen, C. y J. Watkins. 2003. Essential of toxicology. McGraw Hill, New York.
  22. Mamprim, A., L. Alves, F. Pinto, M. Formentini, C. Martins y R. Pares. 2014. Efecto de productos fitosanitarios sobre parámetros biológicos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae). Rev. Protección Veg. 29(2): 128-36.
  23. Mamun, M.S.A. y M. Ahmed. 2011. Prospect of indigenous plant extracts in tea pest management. Int. J. Agr. Res. Innov. Technol. 1(1-2): 16-23.
  24. Marcano, D. y M. Hasegawa. 2002. Fitoquímica Orgánica. UCV-CDCHT, Caracas.
  25. Marčić, D., M. Prijović, T. Drobnjaković, I. Međo, P. Perić y S. Milenković. 2012. Greenhouse and field evaluation of two biopesticides against *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). Pestic. Fitomed. 27(4): 313-20.
  26. Martínez, S. 2002. Composição do nim. In: S. Martínez (ed.). O Nim-*Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina. pp. 23-30
  27. Mohan, M.C., Reddy N.P., Devi U.K., Kongara R. y Sharma H.C. 2007. Growth and insect assays of *Beauveria bassiana* with neem to test their compatibility and synergism. Biocontrol Science and Technology 17(10): 1059-1069.
  28. NAPPO (North American Plant Protection Organization). Detection of Red Palm mite (*Raoiella indica*) in Palm Beach, Florida. <http://www.pestalert.org/opr/Detail.cfm?oprID> (consulta del 20-06-2014).
  29. Návía, D., A. Marsaro Jr, F. da Silva, M. Gondim y G.J. de Moraes. 2011. First report of the red palm mite, *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae) in Brazil. Neotrop. Entomol. 40(3): 409-411.
  30. Pavela, R. 2009. Effectiveness of some botanical insecticides against *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae), *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae)



- and *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Plant Prot. Sci.* 45(4): 161-167.
31. Peña, J., C. Mannion, F. Howard y M. Hoy. 2006. *Raoiella indica* (Prostigmata: Tenuipalpidae): The red palm mite: A potential invasive pest of palms and bananas and other tropical crops of Florida. University of Florida IFAS. <http://edis.ifas.ufl.edu/body> (consulta del 15-07-2014).
  32. Pino, O., Y. Sánchez, M. Rojas, H. Rodríguez, Y. Abreu, Y. Duarte, B. Martínez, B. Peteira, T.M. Correa y D. Martínez, 2011. Composición química y actividad plaguicida del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake. *Rev. Protección Veg.* 26(3): 177-186.
  33. Purwar, J. y G. Sachan 2006. Synergistic effect of entomogenous fungi on some insecticides against Bihar hairy caterpillar *Spilarctia obliqua* (Lepidoptera: Arctiidae). *Microbiol. Res.* 161(1): 38-42.
  34. Reyes, A., J.C. Alejo, E. Ruiz y J.M. Tun. 2012. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas. *Fitosanidad* 16(3): 161-165.
  35. Rodrigues, J., R. Ochoa y E. Kane. 2007. First report of *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae) and its damage to coconut palms in Puerto Rico and Culebra Island. *Int. J. Acarol.* 33(1): 3-5.
  36. Rushda-Sharf, H., A. Merajul y A. Ambreen. 2011. Study of efficacy of leaf extracts of some plants on germination and sporulation of fungi *Paecilomyces lilacinus*. *J. Nat. Prod. Plant Resour.* 1(4): 86-89.
  37. Sabbour M.M. y M.M. Hussein. 2014. The singular and combined effects of entomopathogenic fungi *Beauveria brongniartii* and the insecticide imidacloprid against corn pests under laboratory and field conditions in Egypt. *International Journal of Science and Research* 3(10): 459-465.
  38. Scalvenzi, L., B. Yaguache-Camacho, P. Cabrera-Martínez y Alessandra Guerrini. 2016. Actividad antifúngica *in vitro* de aceites esenciales de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. y *Piper aduncum* L. *Bioagro* 28(1): 39-46.
  39. Shawkat, M.S., A.Q. Khazaal y M.R. Majeed. 2011. Extraction of pyrethrins from *Chrysanthemum cinerariifolium* petals and study its activity against beetle flour *Tribolium castanum*. *Iraqi J. Sci.* 52(4): 456-63.
  40. Shi, W.B. y M.G. Feng. 2004. Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. *Biol. Control* 30: 165-73.
  41. Silva, G., Lagunes A., Rodríguez J.C., Rodríguez D. 2002. Insecticidas vegetales: Una vieja-nueva alternativa en el control de plagas. *Revista Manejo Integrado de Plaga* 66: 4-12.
  42. Urdaneta, L., M.E. Sanabria, D. Rodríguez, M. Pérez. 2013. Grupos de metabolitos secundarios del extracto etanólico de *Gliricidia sepium* y su potencial antifúngico sobre *Colletotrichum acutatum*. *Interciencia* 38(6): 449-54.
  43. van der Geest, L. y J. Bruin. 2009. Diseases of mites and ticks. *In: J. Bruin y L. van der Geest* (eds.). *Diseases of Mites and Ticks: from Basic Pathology to Microbial Control*. Springer. Dordrecht, Netherlands. pp. 3-6.
  44. Vásquez, C. y G.J. Moraes. 2013. Geographic distribution and host plants of *Raoiella indica* and associated mite species in northern Venezuela. *Exp. Appl. Acarol.* 60(1): 73-82.
  45. Vásquez, C. y M.C. Ceballos. 2009. Susceptibilidad de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) a los plaguicidas clorfenapir y abamectina en condiciones de laboratorio. *Idesia* 27(1): 23-28.
  46. Vásquez, C., D. Balza, M.A. Jiménez, Y. Colmenárez y Y. Ríos. 2016. Use of plant extracts as an alternative control method against phytophagous mites in South America. *Curr. Top. Phytochem.* 13: 35-41.
  47. Vásquez, C., M. Quirós, O. Aponte y M.F. Sandoval. 2008. First report of *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae) in South America. *Neotrop. Entomol.* 37(6): 739-40.
  48. Vásquez, C., A. Sivira, M.E. Sanabria, D. Rodríguez, H. Zurita y J. Dlouhy. 2017. Plant ethanolic extracts and entomopathogenic fungi for controlling *Tetranychus urticae* Koch. *Trends in Entomology* 13: 69-78.

49. Vilcinskas, A. y P. Götz. 1999. Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. *Adv. Parasitol.* 43:267-313.

50. Zhang, L., W. Shi y M. Feng. 2014.

Histopathological and molecular insights into the ovicidal activities of two entomopathogenic fungi against two-spotted spider mite. *J. Invert. Pathol.* 117: 73-78.