

## Evaluación de la compatibilidad del proceso de germinación de *Metarhizium anisopliae* con aceites esenciales

Assessment of the compatibility of *Metarhizium anisopliae* germination process with essential oils

Ninfa M. Rosas-García<sup>1\*</sup>, Isela M. Alba-Moreno<sup>1</sup>, Maribel Mireles-Martínez<sup>1</sup>, Jesús M. Villegas-Mendoza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Blvd. del maestro s/n. Col. Narciso Mendoza. Reynosa, Tamaulipas, México. CP 88710. Tel. +52-899-9243627. \*Correo electrónico: nrosas@ipn.mx.

\*Autor de correspondencia

### Resumen

*Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) es un hongo que se utiliza en el control de insectos plaga, al igual que diversos aceites esenciales. Estos recursos podrían usarse de manera combinada para controlar una plaga si son compatibles. Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue determinar la compatibilidad del hongo *M. anisopliae* con diversos aceites esenciales mediante la evaluación del proceso de germinación de las conidias. Se utilizaron cinco cepas de *M. anisopliae* y diez aceites esenciales que se confrontaron en pruebas de compatibilidad. Las cinco cepas fúngicas y los aceites esenciales de ajo, ciprés, eucalipto, limón y naranja fueron compatibles. Los aceites esenciales de canela, clavo y geranio fueron incompatibles; los aceites de lavanda y hierbabuena tuvieron una compatibilidad variable dependiendo de la concentración. El proceso de germinación de las conidias de las cinco cepas fue afectado de manera diferente por la acción de los aceites esenciales probados.

**Palabras clave:** Conidia; compatibilidad; aceite esencial; entomopatógeno.

### Abstract

*Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) is a fungus used in the control of insect pests, as well as various essential oils. These resources could be used in combination to control a pest if they are compatible. For this reason, the objective of this work was to determine the compatibility of the fungus *M. anisopliae* with various essential oils by evaluating the conidia germination process. Five strains of *M. anisopliae* and ten essential oils were used and compared in compatibility tests. The five fungal strains and the essential oils of garlic, cypress, eucalyptus, lemon, and orange were compatible. The essential oils of cinnamon, clove and geranium were incompatible, and the oils of lavender and peppermint had a variable compatibility depending on the concentration. The germination process of the conidia of the five strains was affected differently by the action of the essential oils tested.

**Keywords:** Conidia; compatibility; essential oil; entomopathogen.

Recibido: 26 de junio de 2018

Aceptado: 15 de agosto de 2019

Publicado: 23 de octubre de 2019

**Como citar:** Rosas-García, N. M., Alba-Moreno, I. M., Mireles-Martínez, M., & Villegas-Mendoza, J. M. (2019). Evaluación de la compatibilidad del proceso de germinación de *Metarhizium anisopliae* con aceites esenciales. Acta Universitaria 29, e2320. doi: <http://doi.org/10.15174/au.2019.2320>

## Introducción

El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) pertenece a la familia Moniliaceae. Fue aislado por Ilya Mechnikov en 1879 y a partir de esa fecha este hongo ha sido ampliamente estudiado, observándose de manera natural en más de 300 especies de insectos de diferentes órdenes. *Metarhizium* sp. puede encontrarse en el suelo donde puede sobrevivir por largos periodos o atacando insectos en los cuales causa la enfermedad llamada muscardina verde (Alves, 1998).

Los aceites esenciales son mezclas naturales complejas derivados de plantas aromáticas que pueden contener hasta sesenta compuestos en diferentes concentraciones y esto determina las propiedades biológicas de cada aceite esencial, están constituidos por terpenos, terpenoides, compuestos aromáticos y alifáticos, todos ellos volátiles y de bajo peso molecular (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008). En general, los aceites esenciales son considerados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) como sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS, Generally Recognized As Safety) y tienen una amplia variedad de aplicaciones en las industrias cosmética, farmacéutica, sanitaria, agrícola y alimenticia (Ambrosio, de Alencar, De Sousa, Moreno, & Da Gloria, 2017; Bakkali et al., 2008; Christofoli et al., 2015; Dornic et al., 2018; ElShafei, El-Said, Attia, & Mohammed, 2010; Halla et al., 2018; Khalili et al., 2015; Matusinski, Zouhar, Pavela, & Novy, 2015; Ngumtchouin, Ngassoum, Ngamo, & Cretin, 2010; Prakash, Kedia, Mishra, & Dubey, 2015; Rivera, Crandall, O'Bryan, & Ricke, 2015; Volpe, Nascimento, Insausti, & Grünhut, 2018; Zhaveh et al., 2015).

Una gran variedad de estudios ha demostrado que diversos aceites esenciales derivados de plantas medicinales y comestibles causan efecto inhibitorio en el crecimiento de hongos fitopatógenos (Acosta et al., 2016; Jing et al., 2014; Matusinski et al., 2015; Prakash et al., 2015), en hongos de interés médico como los dermatofitos (Danielli et al., 2017; Mahboubi, HeydaryTabar, & Mahdizadeh, 2017; Mahboubi & Kazempour, 2015). Sin embargo, no existen reportes a la fecha sobre el efecto tóxico de los aceites esenciales en los hongos entomotógenos, particularmente en el hongo *M. anisopliae*. Este conocimiento es importante porque los aceites esenciales además de la actividad antifúngica, tienen un amplio potencial insecticida (Badreddine, Olfa, Samir, Hnia, & Lahbib, 2015; Christofoli et al., 2015; Jemaa, Haouel, Bouaziz, & Khouja, 2012; Jiang, Akhtar, Zhang, Bradbury, & Isman, 2012; Koul, Singh, Kaur, & Kanda, 2013; Ngumtchouin et al., 2013; Polatoglu et al., 2016; Werdin, Gutiérrez, Ferrero, & Fernández, 2014) y pueden incluirse en el manejo integrado de plagas (MIP). El uso de diversos recursos y agentes en el MIP para controlar una plaga hace imprescindible conocer la compatibilidad de aquellos productos que se utilizan para determinar si su acción, al ser aplicados en conjunto, será exitosa, ya que un efecto antagónico sería indeseable. Por este motivo el objetivo de este trabajo fue determinar la compatibilidad del hongo *M. anisopliae* con diversos aceites esenciales mediante la evaluación del proceso de germinación de las conidias.

## Materiales y Métodos

### Cepas fúngicas y aceites esenciales

Las cepas de *M. anisopliae* CHE-CNRCB 223 (Ma56), CHE-CNRCB 237 (Ma57), CHE-CNRCB 225 (Ma60), CHE-CNRCB 227 (Ma62), CHE-CNRCB 232 (Ma67) fueron proporcionadas por el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (Colima, México). Los aceites esenciales que se usaron en este estudio se obtuvieron de diversas casas comerciales. Los aceites esenciales de hierbabuena, lavanda, clavo, canela, geranio y ciprés se obtuvieron de Aloha Cosmetics (Estado de México); naranja y limón de Neal's Yard Remedies (Dorset, UK) y ajo de Maprinsa (Ciudad de México).

## Producción de conidias

Cada cepa fúngica fue inoculada en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de caldo dextrosa Sabouraud enriquecido con 1% de extracto de levadura y suplementado con 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de estreptomycin. Los matraces se incubaron en un agitador rotatorio (STIK, Shaking Incubator PSE Series, Shangai, China) a 200 rpm por 48 h a 28 °C. Posteriormente 9 mL de cada cultivo se mezclaron con 200 mL de agar dextrosa Sabouraud a 40 °C y se vertieron 20 mL de la mezcla en cajas Petri (10 cajas por cepa). Las cepas se incubaron a 28 °C durante 21 días para la producción de las conidias. La recolección de conidias se realizó cubriendo la superficie de cada placa con 5 mL de una solución estéril de Tween 80 al 0.05%. La superficie de cada placa se raspó con una espátula y la suspensión de conidias se recuperó en un frasco con tapa de rosca y la concentración se determinó con una cámara de Neubauer (Rosas-García *et al.*, 2001).

## Compatibilidad de los aceites esenciales con las conidias de *M. anisopliae*

Para determinar el efecto de los aceites esenciales en la germinación de la conidias, se realizaron pruebas de compatibilidad con diez aceites esenciales. Los aceites esenciales se probaron a dos concentraciones, 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  y 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , utilizando como base la concentración comercial insecticida (1 mL L<sup>-1</sup>) reportada por Fontes-Puebla, Fu-Castillo, and López-Arroyo (2012). Los experimentos se realizaron en tubos Falcon de 50 mL conteniendo 20 mL de caldo dextrosa Sabouraud, Tween 80 al 0.05 %, el aceite esencial y una concentración de  $3 \times 10^6$  conidias mL<sup>-1</sup> de cada cepa. Las suspensiones de conidias se incubaron en un agitador rotatorio a 150 rpm y 28 °C  $\pm$  2 °C por 12 h. Posteriormente, los porcentajes de germinación de las conidias se determinaron con una cámara de Neubauer. Cada experimento se repitió cinco veces. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) with Minitab v. 17, *Statistical software* (State College PA, USA).

## Resultados

La compatibilidad de los aceites esenciales con la germinación de las conidias de todas las cepas probadas de *M. anisopliae* mostró diferencia significativa a la concentración de 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (tabla 1).

**Tabla 1.** Compatibilidad de la germinación de las conidias de *M. anisopliae* con diferentes aceites esenciales a la concentración de 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$

Aceite esencial†	Porcentaje de la germinación de las conidias (Media $\pm$ EE*)					F	Sig.
	Ma56	Ma57	Ma60	Ma62	Ma67		
Control ‡	98.60 $\pm$ 0.24a	96.60 $\pm$ 0.74a	97.60 $\pm$ 0.40a	98.40 $\pm$ 0.24a	98.00 $\pm$ 0.31a	--	NS
Ajo	97.20 $\pm$ 0.86a	97.20 $\pm$ 1.11a	97.20 $\pm$ 1.71a	97.20 $\pm$ 1.1a	97.60 $\pm$ 0.40a	0.03	NS
Canela	1.60 $\pm$ 1.60c	0.00 $\pm$ 0.00d	1.00 $\pm$ 1.00c	0.40 $\pm$ 0.40c	0.60 $\pm$ 0.40c	0.48	NS
Ciprés	96.40 $\pm$ 0.51a	95.80 $\pm$ 2.03a	97.20 $\pm$ 1.71a	95.80 $\pm$ 3.71a	96.00 $\pm$ 1.52a	0.07	NS
Clavo	1.00 $\pm$ 0.31c	2.80 $\pm$ 0.86d	2.20 $\pm$ 1.56c	0.80 $\pm$ 0.37c	1.00 $\pm$ 0.31c	1.12	NS

Eucalipto	97.4 ± 0.50a	<u>93.00 ± 0.83a</u>	95.40 ± 1.21a	95.00 ± 0.89a	98.00 ± 0.89a	4.99	*
Geranio	3.80 ± 0.80c	<u>1.40 ± 0.51d</u>	<u>0.80 ± 0.37c</u>	2.60 ± 0.24c	4.00 ± 1.05c	4.57	*
Lavanda	77.20 ± 2.44b	79.40 ± 2.84b	81.20 ± 3.17b	84.20 ± 1.62b	81.80 ± 4.07b	0.8	NS
Limón	99.60 ± 0.24a	99.20 ± 0.20a	99.60 ± 0.40a	99.00 ± 0.00a	<u>98.00 ± 0.31a</u>	6	*
Hierbabuena	98.40 ± 0.24a	<u>54.40 ± 7.81c</u>	94.80 ± 2.60a	85.80 ± 3.38b	86.6 ± 0.74b	18.94	*
Naranja	97.60 ± 0.40a	98.00 ± 0.44a	98.60 ± 0.51a	98.00 ± 0.31a	98.00 ± 0.54a	0.63	NS
F	1960.89	264.06	757.16	690.63	936.24		

†Concentración de 10 µL mL<sup>-1</sup>. ‡Caldo Sabouraud dextrosa + Tween 80 al 0.05 %. \*Valores en la misma columna con diferente letra son significativamente diferentes. Prueba de Tukey ( $p = 0.05$ ),  $df = 10/44$ ,  $p < 0.00$ . Los valores subrayados en la misma fila son significativamente diferentes. Prueba de Tukey ( $p = 0.05$ ),  $df = 4/20$ ,  $p < 0.00$ .

Fuente: Elaboración propia.

El proceso de germinación en todas las cepas fue compatible con la exposición de los aceites de ajo, ciprés, eucalipto, limón y naranja y los porcentajes de germinación fueron superiores al 93%. La germinación de las conidias fue menor al 4% en presencia de los aceites de canela, clavo y geranio, por lo que estos aceites se consideraron incompatibles para todas las cepas. Adicionalmente la germinación de las conidias de la cepa Ma57 fue incompatible con el aceite de eucalipto y la germinación de la cepa Ma60 fue incompatible con el aceite de geranio. La germinación de las conidias de la cepa Ma67 fue incompatible con el aceite esencial de limón y la de la cepa Ma57 fue incompatible con el aceite de hierbabuena.

Los aceites esenciales aplicados a la concentración de 10 µL mL<sup>-1</sup> también mostraron diferencias significativas entre las cepas con respecto a la compatibilidad con la germinación de las conidias (tabla 2).

**Tabla 2.** Compatibilidad de la germinación de las conidias *M. anisopliae* con diferentes aceites esenciales a la concentración de 10 µL mL<sup>-1</sup>

Porcentaje de la germinación de las conidias (Media ± EE*)							
Aceite esencial†	Ma56	Ma57	Ma60	Ma62	Ma67	F	Sig.
Control ‡	98.60 ± 0.24a	96.60 ± 0.74a	97.60 ± 0.40a	98.40 ± 0.24ab	98.0 ± 0.31ab	--	NS
Ajo	98.0 ± 0.31a	97.20 ± 1.11a	98.60 ± 0.92a	98.40 ± 0.40ab	97.20 ± 0.37ab	0.03	NS
Canela	1.80 ± 0.91b	0.80 ± 0.58b	1.40 ± 0.60b	0.60 ± 0.40c	0.80 ± 0.49c	0.65	NS
Ciprés	99.60 ± 0.40a	95.80 ± 3.71a	98.60 ± 0.67a	95.60 ± 1.83ab	98.20 ± 0.58ab	0.87	NS
Clavo	0.60 ± 0.40b	0.80 ± 0.37b	0.80 ± 0.49b	1.60 ± 0.60c	1.40 ± 0.40c	0.89	NS
Eucalipto	98.00 ± 0.31a	<u>99.40 ± 0.24a</u>	<u>96.80 ± 0.49a</u>	98.60 ± 0.24ab	98.80 ± 0.20a	9.72	*

Geranio	1.40 ± 0.40b	0.80 ± 0.58b	0.20 ± 0.20b	0.60 ± 0.24c	0.40 ± 0.24c	1.61	NS
Lavanda	2.40 ± 0.67b	1.80 ± 0.66b	2.00 ± 0.31b	1.00 ± 0.31c	0.80 ± 0.20c	2.02	NS
Limón	99.40 ± 0.24a	99.20 ± 0.20a	99.20 ± 0.37a	98.60 ± 0.51ab	98.60 ± 0.51a	0.92	NS
Hierbabuena	2.60 ± 0.40b	2.80 ± 1.24b	2.00 ± 0.31b	1.20 ± 0.20c	1.00 ± 0.31c	1.68	NS
Naranja	97.80 ± 0.86a	97.40 ± 0.67a	97.20 ± 0.73a	98.80 ± 0.49a	96.60 ± 0.24b	1.64	NS
F	9373.58	1469.74	8664.14	5817.85	18339.71		

†Concentración de 10 µL mL<sup>-1</sup>. ‡Caldo Sabouraud dextrosa + Tween 80 al 0.05 %. \*Valores en la misma columna con diferente letra son significativamente diferentes. Prueba de Tukey (p = 0.05), df = 10/44, p < 0.00. Los valores subrayados en la misma fila son significativamente diferentes. Prueba de Tukey (p = 0.05), df = 4/20, p < 0.00.

Fuente: Elaboración propia.

Los aceites de lavanda y hierbabuena permitieron hasta 2.8% de la germinación de las conidias en todas las cepas. El aceite de eucalipto fue el más compatible con la cepa Ma57 y la cepa Ma60 fue la más incompatible con este aceite.

## Discusión

El proceso de germinación de las conidias de las cinco cepas fue afectado de manera diferente por la acción de los aceites esenciales probados. En general, las cinco cepas resultaron ser altamente incompatibles con los aceites de canela, clavo y geranio, por lo que la germinación de las conidias solo fue del 4% a 5 µg mL<sup>-1</sup> y 10 µg mL<sup>-1</sup>. Los aceites esenciales de ajo, ciprés, eucalipto, limón y naranja fueron compatibles con el proceso de germinación a alta y baja concentraciones permitiendo una germinación cercana al 100%. El aceite de hierbabuena solo fue compatible a baja concentración con la germinación de las cepas Ma56 y Ma60 (superior al 94%) y a alta concentración fue incompatible con este proceso en todas las cepas. En la cepa Ma57, el aceite de hierbabuena redujo la germinación a 54% y el aceite de lavanda exhibió un comportamiento similar al de la hierbabuena, pero inhibió el proceso de germinación a alta concentración. Se observa que la actividad de estos dos aceites esenciales es dependiente de la concentración.

En este estudio se observa que los aceites esenciales tienen diferentes efectos sobre las conidias y las cepas ofrecen diferentes respuestas en la interacción con los aceites esenciales. Se observa que el mismo aceite esencial puede causar efectos diferentes en cepas diferentes, lo que indica que los aceites esenciales tienen especificidad en el modo de acción y esta a su vez puede depender de la concentración a la que se aplica, de acuerdo a resultados similares obtenidos por Arslan and Dervis (2010), quienes relacionaron la concentración de los aceites esenciales de romero, tomillo, salvia y oregano con la actividad antifúngica hacia el hongo *Verticillium dahliae*. Por otra parte, las cepas presentan diferente sensibilidad a la acción de un aceite en particular, por lo tanto, la actividad específica y la concentración de un aceite esencial son parámetros muy importantes que deben ser considerados en el diseño de insecticidas biológicos (Sánchez et al., 2011). De acuerdo con varios reportes, algunos aceites vegetales se utilizan para preparar suspensiones miscibles para la aplicación de hongos ya que mantienen la tasa de germinación y la infectividad de la conidia (Mola & Afkari, 2012; Peng, Wang, Yin, Zeng, & Xia, 2008). Así mismo, se ha observado que los aceites vegetales repelen o atraen a los insectos (Luz & Batagin, 2005) o simplemente no tienen efectos sobre ellos, sin embargo estos efectos no se han definido adecuadamente y sería posible que

los aceites esenciales tuvieran una función similar. Los resultados indican que existen algunos aceites esenciales que son compatibles con el proceso de germinación de las conidias de *M. anisopliae* y que podrían ser utilizados potencialmente en el control de plagas. Algunos aceites como el de canela, clavo y geranio que inhibieron la germinación de las conidias, independientemente de sus propiedades insecticidas, no podrán ser aplicados de manera conjunta con este hongo para el control de insectos plaga. Se deberán realizar más estudios para definir y diseñar la combinación hongo-aceite esencial con mayores propiedades patogénicas y tóxicas que pueda ser aplicada en el control de plagas.

## Conclusiones

Los aceites esenciales de ajo, ciprés, eucalipto, limón y naranja fueron compatibles con el proceso de germinación de las conidias de cinco cepas de *M. anisopliae* y potencialmente pueden ser utilizados de forma combinada para el control de plagas de insectos. Por otro lado, los aceites esenciales de canela, clavo y geranio no pueden ser utilizados de manera conjunta con las conidias del hongo *M. anisopliae* ya que no permiten la germinación de las conidias en las cepas probadas, reduciendo con ello las posibilidades de control que ejerce el hongo sobre los insectos. Los aceites esenciales de lavanda y hierbabuena podrían ser utilizados en combinación con el hongo, siempre y cuando se defina una concentración adecuada.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Fondo Mixto del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Estado de Tamaulipas-Gobierno del Estado de Tamaulipas proyecto 177372 y a la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional proyectos de investigación 20130492, 20140584, 20150437 y proyecto de Innovación 20164853 por el financiamiento económico. Así mismo agradecen al Centro Nacional de Referencia de Control Biológico por proporcionar las cepas fúngicas.

## Referencias

- Acosta, S., Chiralt, A., Santamarina, P., Rosello, J., González-Martínez, C., & Cháfer, M. (2016). Antifungal films based on starch-gelatin blend, containing essential oils. *Food Hydrocolloids*, *61*, 233-240. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.008>
- Alves, S. B. (1998). Fungos entomopatogénicos. En: S. B. Alves (Ed.), *Controle Microbiano de Insetos* (pp. 289-381). Brasil: Piracicaba FEALQ.
- Ambrosio, C. M. S., De Alencar, S. M., de Sousa, R. L. M., Moreno, A. M., & Da Gloria, E. M. (2017). Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. *Industrial Crops and Products*, *97*, 128-136. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.045>
- Arslan, M., & Dervis, S. (2010). Antifungal activity of essential oils against three vegetative-compatibility groups of *Verticillium dahliae*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *26*(10), 1813-1821. doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0362-2>
- Badreddine, B. S., Olfa, E., Samir, D., Hnia, C., & Lahbib, B. J. M. (2015). Chemical composition of *Rosmarinus* and *Lavandula* essential oils and their insecticidal effects on *Orgyia trigotephras* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *8*(2), 98-103. doi: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60298-4](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60298-4)
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(2), 446-475. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Christofoli, M., Candida, C. E. C., Bicalho, K. U., De Cássia, D. V., Fernandes, P. M., Fernandes, A. C. C., Araujo, W. L., & De Melo, C. C. (2015). Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) in *Bemisia tabaci* populations. *Industrial Crops and Products*, *70*, 301-308. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.025>

- Danielli, L. J., Pippi, B., Soares, K. D., Duarte, J. A., Maciel, A. J., Machado, M. M., Oliveira, L. F. S., Bordignon, S. A. L., Fuentesfria, A. M., & Apel, M. A. (2017). Chemosensitization of filamentous fungi to antifungal agents using *Nectandra* Rol. ex Rottb. species essential oils. *Industrial Crops and Products*, 102, 7-15. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.013>
- Dornic, N., Roudot, A. C., Batardiére, A., Nedelec, A. S., Bourgeois, P., Hornez, N., Caer, F. L., & Ficheux, A. S. (2018). Aggregate exposure to common fragrance compounds: Comparison of the contribution of essential oils and cosmetics using probabilistic methods and example of limonene. *Food and Chemical Toxicology*, 116(Part B), 77-85. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.017>
- ElShafei, G. M. S., El-Said, M. M., Attia, H. A. E., & Mohammed, T. G. M. (2010). Environmentally friendly pesticides: Essential oil-based w/o/w multiple emulsions for anti-fungal formulations. *Industrial Crops and Products*, 31(1), 99-106. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.09.010>
- Fontes-Puebla, A. A., Fu-Castillo, A. A., & López-Arroyo, J. I. (2012). Eficacia de productos orgánicos foliares para el control de ninfa y adultos de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Revista Biotecnia*, 14(2), 26-31. doi: <http://dx.doi.org/10.18633/bt.v14i2.120>
- Halla, N., Heleno, S. A., Costa, P., Fernandes, I. P., Calhela, R. C., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R., & Barreiro, M. F. (2018). Chemical profile and bioactive properties of the essential oil isolated from *Ammodaucus leucotrichus* fruits growing in Sahara and its evaluation as a cosmeceutical ingredient. *Industrial Crops and Products*, 119, 249-254. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.043>
- Jemaa, J. M. B., Haouel, S., Bouaziz, M., & Khouja, M. L. (2012). Seasonal variations in chemical composition and fumigant activity of five *Eucalyptus* essential oils against three moth pests of stored dates in Tunisia. *Journal of Stored Products Research*, 48, 61-67. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2011.10.001>
- Jiang, Z. L., Akhtar, Y., Zhang, X., Bradbury, R., & Isman, M. B. (2012). Insecticidal and feeding deterrent activities of essential oils in the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*, 136(3), 191-202. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01587.x>
- Jing, L., Lei, Z., Li, L., Xie, R., Xi, W., Guan, Y., Summer, L. W., & Zhou, Z. (2014). Antifungal activity of citrus essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(14), 3011-3033. doi: <https://doi.org/10.1021/jf5006148>
- Khalili, S. T., Mohsenifar, A., Beyki, M., Zhavah, S., Rahmani-Cherati, T., Abdollahi, A., Bayat, M., & Tabatabaei, M. (2015). Encapsulation of thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 502-508. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.054>
- Koul, O., Singh, R., Kaur, B., & Kanda, D. (2013). Comparative study on the behavioral response and acute toxicity of some essential oils compounds and their binary mixtures to larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura*, and *Chilo partellus*. *Industrial Crops and Products*, 49, 428-436. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.05.032>
- Luz, C., & Batagin, I. (2005). Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*. *Mycopathologia*, 160(1), 51-62. doi: <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0210-3>
- Mahboubi, M., HeydaryTabar, R., & Mahdizadeh, E. (2017). The anti-dermatophyte activity of *Zataria multiflora* essential oils. *Journal of Mycologie Médicale*, 27(2), 232-237. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.03.001>
- Mahboubi, M., & Kazempour, N. (2015). The antifungal activity of *Artemisia sieberi* essential oil from different localities of Iran against dermatophyte fungi. *Journal of Mycologie Médicale*, 25(2), e65-e71. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.02.042>
- Matusinski, P., Zouhar, M., Pavela, R., & Novy, P. (2015). Antifungal effect of five essential oils against important pathogenic fungi of cereal. *Industrial Crops and Products*, 67, 208-215. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.022>
- Mola, F. L., & Afkari, R. (2012). Effects of different vegetable oils formulations on temperature tolerance and storage duration of *Beauveria bassiana* conidia. *African Journal of Microbiology Research*, 6(22), 4707-4711. doi: <https://doi.org/10.5897/AJMR11.1372>
- Nguemtchouin, M. G. M., Ngassoum, M. B., Chalier, P., Kamga, R., Ngamo, L. S. T., & Cretin, M. (2013). *Ocimum gratissimum* essential oil and modified montmorillonite clay, a means of controlling insect pests in stored products. *Journal of Stored Products Research*, 52, 57-62. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2012.09.006>

- Nguemtchouin, M. M. G., Ngassoum, M. B., Ngamo, L. S. T., & Cretin, M. (2010). Insecticidal formulation based on *Xylopi aethiopicica* essential oil and kaolinite clay for maize protection. *Crop Protection*, 29(9), 985-991. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.06.007>
- Peng, G., Wang, Z., Yin, Y., Zeng, D., & Xia, Y. (2008). Field trials of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Ascomycota: Hypocreales) against oriental migratory locusts, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) in Northern China. *Crop Protection*, 27(9), 1244-1250. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.03.007>
- Polatoglu, K., Cem Karakoç, Ö., Yücel, Y. Y., Gücel, S., Demirci, B., Can Baser, K. H., & Demirci, F. (2016). Insecticidal activity of edible *Crithmum maritimum* L. essential oil against coleopteran and lepidopteran insects. *Industrial Crops and Products*, 89, 383-389. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.032>
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. *Food Control*, 47, 381-391. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.023>
- Rivera, C. J., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobial in food systems - A review. *Food Control*, 54, 111-119. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
- Rosas-García, N. M., Arévalo-Niño, K., Medrano-Roldán, H., Galán- Wong, L. J., Luna-Olvera, H. A., & Morales-Ramos, L. H. (2001). Spray-dried encapsulated *Beauveria bassiana* formulations using biodegradable polymers. *Southwestern Entomologist*, 26(3), 259-267.
- Sánchez, Y., Pino, O., Lazo, F. J., Abreu, Y., Naranjo, E., & Iglesia, A. (2011). Actividad promisorio de aceites esenciales de especies pertenecientes a la tribu Pipereae frente a *Artemia salina* y *Xanthomonas albilineans*. *Revista de Protección Vegetal*, 26(1), 45-51.
- Volpe, V., Nascimento, D. S., Insausti, M., & Grünhut, M. (2018). Octyl *p*-methoxycinnamate loaded microemulsion based on *Ocimum basilicum* essential oil. Characterization and analytical studies for potential cosmetic applications. *Colloids and Surfaces A*, 546, 285-292. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.02.070>
- Werdin, G. J. O., Gutiérrez, M. M., Ferrero, A. A., & Fernández, B. B. (2014). Essential oils nanoformulations for stores-product pest control - Characterization and biological properties. *Chemosphere*, 100, 130-138. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.056>
- Zhaveh, S., Mohsenifar, A., Beiki, M., Khalili, S. T., Abdollahi, A., Rahmani-Cherati, T., & Tabatabaei, M. (2015). Encapsulation of *Cuminum cyminum* essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products*, 69, 251-256. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.028>