

***Beauveria bassiana* Y *Trichoderma spp.* COMO CONTROLADORES DEL
VECTOR DE LA ENFERMEDAD HUANGLONGBING EN PLANTAS DE *Citrus*
*limon***

***Beauveria bassiana* AND *Trichoderma spp.* AS VECTOR CONTROLLERS OF
HUANGLONGBING DISEASE IN *Citrus limon* PLANTS**

**ANGARITA PARALES YEINY LISBETH
VIBEL YOJANA URECHE URECHE
Autores**

**UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR
FACULTAD CIENCIAS BÁSICAS
MICROBIOLOGIA
2023**

***Beauveria bassiana* Y *Trichoderma spp.* COMO CONTROLADORES DEL
VECTOR DE LA ENFERMEDAD HUANGLONGBING EN PLANTAS DE *Citrus
limon***

***Beauveria bassiana* AND *Trichoderma spp.* AS VECTOR CONTROLLERS OF
HUANGLONGBING DISEASE IN *Citrus limon* PLANTS**

**ANGARITA PARALES YEINY LISBETH
VIBEL YOJANA URECHE URECHE
Autores**

Trabajo de titulación presentado conforme a los requerimientos instituidos para
optar por el título de Microbióloga

**ASLENIS EMIDIA MELO RIOS
Directora**

**SANDRA PACHECO JULIO
Codirectora**

**UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR
FACULTAD CIENCIAS BÁSICAS
MICROBIOLOGIA
2023**





***Beauveria bassiana* Y *Trichoderma spp.* COMO CONTROLADORES DEL
VECTOR DE LA ENFERMEDAD HUANGLONGBING EN PLANTAS DE *Citrus
limon***

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Popular del Cesar y en especial al grupo de investigación Parasitología - Agroecología Milenio del programa de Microbiología y con ello a cada uno de los docentes que lo conforman, por hacer posible este sueño y que esta tesis se desarrollará en sus instalaciones además por brindarnos el apoyo y acompañamiento durante todo el proceso en el laboratorio.

A nuestras directoras de proyecto de grado: Aslenis Emidia Melo Ríos, por haber compartido la idea principal de esta tesis, porque además de orientarnos como docente nos enriqueció como personas y tuvo las palabras correctas para animarnos al momento de querer desistir y a la docente Sandra Milena Pacheco Julio, por su trabajo y cooperación.

Agradezco a Dios el permitirme alcanzar esta meta en mi vida, por su infinito amor, por haberme dado la salud y la fortaleza que necesite a lo largo de este caminar.

A mi querido esposo Miguel por su ayuda, paciencia, comprensión, buenos consejos, por estar conmigo en los momentos buenos y difíciles que tuve en todo este proceso, además de su cariño y apoyo financiero.

A mi madre por sus palabras de aliento, por sus buenos deseos, por escucharme, por su confianza, por todo su afecto y por todas sus enseñanzas.

A mis hermanos por haber sido quienes me encaminaron a alcanzar este peldaño en mi vida, además, de su contribución económica.

A mi compañera y colega Yeiny Angarita por brindarme su confianza, amistad y por su empeño en sacar adelante este proyecto.

A mis amigos y a todas las personas que me brindaron su compañía, motivación y apoyo para seguir adelante.

Con especial afecto, Vibel Ureche.

Primeramente, agradezco a Dios por darme las fuerzas necesarias para afrontar cualquier adversidad y por llenarme de valor y sabiduría para poder emprender este proyecto.

De la misma forma a mis padres que siempre me han brindado su apoyo incondicional para poder llevar a cabo propósitos personales y también académicos, que con amor me han impulsado a siempre esforzarme por perseguir mis objetivos y nunca desistir, además de eso también son los que han brindado una ayuda económica para poder cumplir todos los objetivos planteados en este documento.

A mi compañera y colega Vibel Yojana Ureche Ureche por brindarme su amistad, apoyo incondicional comprensión y dedicación, agradezco por la paciencia y la motivación brindada a lo largo de este proceso.

A mis amigos, compañeros y finalmente a todas aquellas personas que alguna u otra forma fueron soporte durante el desarrollo de la tesis.

Con cariño, Yeiny Angarita.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi padre que, aunque no está aquí conmigo sé que desde el cielo se siente orgulloso de este gran logro, por cada día haberme alentado a esforzarme por ser una gran persona, por brindarme todo su amor y cariño mientras tuvo vida, por todas sus enseñanzas de vida y por siempre ser mi sostén.

A mi madre que siempre ha estado allí para brindarme su amor, apoyo y por ser mi fortaleza en los peores momentos de mi vida, por haberme enseñado valores, y a dar siempre lo mejor de mi sin esperar nada a cambio.

A mis hermanos y sobrinos por ser ese apoyo emocional en momentos difíciles y por alentarme a seguir adelante sin importar los obstáculos o dificultades que trae consigo cada proceso.

Con mucho amor, Yeiny Angarita

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi esposo por ayudarme a no rendirme, a que con perseverancia, disciplina, coraje y determinación se pueden alcanzar las metas.

A mi madre por haberme dado dos regalos preciosos, la oportunidad de venir al mundo y, la semilla de la fe y confianza en Dios, que con esto último los sueños se pueden hacer posibles.

Con amor, Vibel Ureche.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
2.1. Formulación del problema	18
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. OBJETIVOS	21
4.1.1. Objetivo general	21
4.1.2. Objetivos específicos	21
5. MARCO TEORICO	22
5.1. Antecedentes	22
5.2. Marco conceptual	24
5.2.1. Huanglongbing	24
5.2.2. Hospedantes	25
5.2.3. Agente causal	25
5.2.4. Vector	26
5.2.5. <i>Trioza Erytraeae</i>	26
5.2.6. <i>Diaphorina citri</i>	27
5.2.7. Distribución geográfica	28
5.2.8. Sintomatología	29
5.2.9. Control	29
5.2.10. Control químico y físico	29
5.2.11. Control biológico	30
5.2.12. Enemigos naturales	30
5.2.13. Aplicación de los hongos en el control biológico	30
5.2.14. <i>Beauveria bassiana</i>	31
5.2.15. <i>Trichoderma spp.</i>	31
5.3. Marco legal	32
6. METODOLOGÍA	33

- 6.1. Tipo de estudio y línea de investigación 33
- 6.2. Área de estudio 34
- 6.3. Población de estudio 34
- 6.4. Técnicas de obtención de datos 34
 - 6.4.1. Inspección y visualización del área de estudio 34
 - 6.4.2. Instrumentos de medición 34
 - 6.4.3. Muestra 34
 - 6.4.4. Tipo de muestreo 34
 - 6.4.5. Material biológico 35
- 6.5. Diseño metodológico 35
 - 6.5.1. Determinación del nivel de daño del Huanglongbing 35
 - 6.5.2. Porcentaje de severidad 35
 - 6.5.3. Evaluación del nivel de daño por variables morfológicas en hojas 36
 - 6.5.4. Análisis estadístico 36
 - 6.5.5. Identificación y determinación del nivel de infestación de *Diaphorina citri* 37
 - 6.5.6. Análisis estadístico 37
 - 6.5.7. Preparación y aplicación de los bioinsumos 37
 - 6.5.8. Multiplicación de los hongos 37
 - 6.5.9. Solución madre y recuento en cámara de Neubauer 37
 - 6.5.10. Prueba de patogenicidad in vitro 38
 - 6.5.11. Aplicación de los bioinsumos en campo 39
 - 6.5.12. Tratamientos aplicados en campo 39
 - 6.5.13. Potencial de *Trichoderma spp.* en la disminución del DE frente a Huanglongbin en plantas de Citrus limón 38
- 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 40
 - 7.1. Identificación de *Diaphorina citri* en plantas de limón 40
 - 7.2. Determinación del nivel de daño económico por Huanglongbing 41
 - 7.3. Determinación del nivel de infestación 43
 - 7.4. Solución madre y recuento en cámara de Neubauer 46
 - 7.5. Prueba de patogenicidad in vitro 46

- 7.6. Potencial de *Trichoderma* en la disminución del DE frente a Huanglongbin en plantas de Citrus limón 48
8. CONCLUSIONES 51
9. RECOMENDACIONES 52
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 53
11. ANEXO 17

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Representación del área de estudio 32
- Figura 2** Representación del dosel arbóreo o copas de los árboles 35
- Figura 3** Representación de los tratamientos aplicados en campo 39
- Figura 4** Inspección del área de estudio 41
- Figura 5** Árboles 7 y 8 postratamiento con desarrollo de limones 49
- Figura 6** Dos muestras de limones tomadas del árbol 849

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1** Escala de severidad total 35
- Tabla 2** Tratamientos para aplicar en prueba de patogenicidad en laboratorio 37
- Tabla 3** Prueba de Duncan del NDE postratamiento.....42
- Tabla 4** Prueba de Duncan del nivel de infestación pretratamiento y postratamiento 44
- Tabla 5** Prueba de Duncan del porcentaje de mortalidad 47
- Tabla 6** Resultados de las variables morfológicas tomadas de las muestras 50

INDICE DE GRÁFICAS

- Gráfica 1** Porcentaje de severidad pretratamiento 41
- Gráfica 2** Porcentaje de severidad postratamiento 42
- Gráfica 3** Nivel de infestación pretratamiento por árbol 43
- Gráfica 4** Nivel de infestación postratamiento por árbol 44
- Gráfica 4** Porcentaje de mortalidad vs tiempo 48

RESUMEN

Los cítricos son un grupo de frutas que se caracterizan principalmente por su jugosidad y aroma, la industria de los cítricos es un área muy interesante porque sus aplicaciones pueden variar. sin embargo, los problemas fitosanitarios no son ajenos a este tipo de cultivos, la enfermedad de los cítricos más devastadora del mundo es Huanglongbing (HLB), una enfermedad que se propaga rápidamente, esta es causada por una bacteria gramnegativa del género *Candidatus liberibacter*, por lo tanto se ha optado por el uso de microorganismos como controladores biológicos, a fin controlar plagas y enfermedades; por lo cual, el objetivo de esta investigación consiste en evaluar la eficiencia de los hongos patógenos *Beauveria bassiana* y *Trichoderma* como controladores biológicos de *Diaphorina citri*, vector de la enfermedad Huanglongbing en plantas de limón ubicadas en el parque La Vallenata en la ciudad de Valledupar – César, para ello se midió el porcentaje de severidad y la severidad total de la enfermedad por número de árboles con escala aritmética por variables morfológicas en hojas, en campo se aplicaron los siguientes tratamientos T1=*Beauveria bassiana*, T2=*Trichoderma spp.*, T3=*Beauveria bassiana* + *Trichoderma spp.*, T4=Control químico y 1 árbol como testigo (T0), se realizó también una prueba de patogenicidad en laboratorio donde se recolectaron 36 muestras de psílicos adultos vivos de las plantas se usaron los siguientes tratamientos; T1: *Beauveria bassiana*, T2: *Trichoderma spp.*, T3: *B. bassiana* + *Trichoderma spp.* Y T:0 control. Los resultados en el Nivel de Daño pretratamiento se obtuvo que todos los árboles a excepción del testigo se clasificaron en Clase 2 y postratamiento hubo un efecto positivo para todos los árboles tratados quedando en Clase 1 del Nivel de Daño, con producción de limones en los árboles 7, 8, 9 y 10. En el nivel de infestación no se logró la misma

eficiencia, el control químico presentó el mejor resultado con un nivel de infestación

promedio de 0,75 de insectos por rama. En la prueba de patogenicidad in vitro el T3 alcanzó porcentajes de mortalidad del 100% a las 21:30 horas del día 2. Se concluye que resulta eficiente el control biológico empleando ambos hongos.

Palabras claves: Biocontrol, vector, enfermedad, plaga, patogenicidad

ABSTRACT

Citrus are a group of fruits that are mainly characterized by their juiciness and aroma. The citrus industry is a very interesting area because its applications can vary. However, phytosanitary problems are not alien to this type of crops, the most devastating citrus disease in the world is Huanglongbing (HLB), a disease that spreads rapidly, it is caused by a gram-negative bacterium of the genus *Candidatus Liberibacter*, by Therefore, the use of microorganisms as biological controllers has been chosen, in order to control pests and diseases; Therefore, the objective of this research is to evaluate the efficiency of the pathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Trichoderma* as biological controllers of *Diaphorina citri*, vector of the Huanglongbing disease in lemon plants located in the La Vallenata park in the city of Valledupar - César, for this the percentage of severity and the total severity of the disease were measured by number of trees with an arithmetic scale by morphological variables. on leaves, in the field the following treatments were applied T1=*Beauveria bassiana*, T2=*Trichoderma* spp., T3=*Beauveria bassiana* + *Trichoderma* spp., T4=Chemical control and 1 tree as a control (T0), a pathogenicity test was also carried out In the laboratory where 36 samples of live adult psyllids from the plants were collected, the following treatments were used: T1: *Beauveria bassiana*, T2: *Trichoderma* spp., T3: *B. bassiana* + *Trichoderma* spp. And T:0 control. The results in the pre-treatment Damage Level showed that all the trees, except for the control, were classified in Class 2 and post-treatment there was a positive effect for all the treated trees, remaining in Class 1 of the Damage Level, with production of lemons in the trees. 7, 8, 9 and 10. At the level of infestation the same efficiency was not achieved, the chemical control

presented the best result with an average infestation level of 0.75 insects per branch. In the in vitro pathogenicity test, T3 reached mortality rates of 100% at 9:30 p.m. on day 2. It is concluded that biological control using both fungi is efficient.

Keywords: Biocontrol, vector, disease, plague, pathogenicity

1. INTRODUCCIÓN

Los cítricos son un grupo de frutas que se caracterizan principalmente por su jugosidad y aroma, y en agricultura son una alternativa muy viable a los cultivos, ya que tienen un período de crecimiento de 30 a 40 años y se pueden utilizar en climas subtropicales. (Soto, 2020).

Además, la industria de los cítricos es un área muy interesante porque sus aplicaciones pueden variar. En las primeras etapas, es la venta de frutas (limones, naranjas, limas, naranjas, toronjas, etc.) para productos industriales y productos derivados de ellos (jugo, néctar, concentrados, pulpa, mermelada, aceite, etc.), por lo que los cítricos son la especie más buscada a nivel mundial y su comercio favorece principalmente a aquellos países donde las condiciones climáticas le permiten crecer de manera óptima, sin embargo los problemas fitosanitarios no son ajenos a este tipo de cultivos, la enfermedad de los cítricos más devastadora del mundo es el Huanglongbing (HLB), se propaga rápidamente, esta es causada por una bacteria gramnegativa del género *Candidatus liberibacter*, pertenece a una clase de microorganismos que no se pueden cultivar en el laboratorio con métodos convencionales, lo que dificulta su caracterización y clasificación.

El nombre *liberibacter* es una palabra compuesta derivada de dos palabras latinas liber (corteza) y bacteria (bacteria). Se cree que tres tipos causan la enfermedad: *Candidatus liberibacter asiaticus*, *Candidatus liberibacter*

africanus y *Candidatus liberibacter americanus*. (Bove et. al, 2009). Estas bacterias son introducidas en el floema de la planta huésped por un vector y, a medida que viajan a través del sistema vascular, contaminan toda la planta y causan la muerte de la planta después de 2 o 3 años. (Garza et. al, 2017).

Actualmente no existe un tratamiento eficaz para el HLB, por lo que es necesaria la detección temprana para efectuar un correcto tratamiento o en el peor de los casos la eliminación de los árboles infectados para ayudar a reducir y controlar la propagación de la enfermedad en los huertos y otros árboles en toda la región, la medida de control dominante actualmente en uso es la combinación de rociado de insecticidas cuando estos presentan síntomas, convirtiéndose en una estrategia que solo ha tenido un efecto marginal, ya que dichos síntomas aparecen entre meses y años después de la infección (Lee et. al, 2015), por tal razón el objetivo de esta investigación fue evaluar la eficiencia de los hongos patógenos *Beauveria bassiana* y *Trichoderma* como controladores biológicos de *Diaphorina citri*, vector de la enfermedad Huanglongbing en plantas de limón ubicadas en el parque La Vallenata en la ciudad de Valledupar - César.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad Huanglongbing (HLB) está ocasionando serias afectaciones en los cultivos cítricos a nivel mundial, por lo agresiva y la rápida diseminación de su sintomatología, lo que hace que sea considerada la enfermedad más devastadora de los cítricos, afectando a todas sus variedades comerciales (Gómez García, 2018). Dicha enfermedad produce malformación en los frutos, debilitamiento de las raíces y bloqueo del floema por excesivo acumulo de almidón, los huertos quedan económicamente inhabilitados por un periodo aproximado de 10 años después de ser detectada la enfermedad (Devia, 2020). Así mismo, ocasiona la destrucción en el valor económico de las frutas y la muerte de las plantas (Hussain et al., 2018).

Es por ello, que El PAC (Psílido Asiático de los Cítricos) *Diaphorina citri* Kuwayama, ha provocado la muerte de millones de árboles en el mundo (Palomarez et al., 2015), alrededor de más de 63 millones de árboles, principalmente en Asia, Sudáfrica y Brasil (Garza et al., 2017), reportados para el año 2016. Pese a los esfuerzos realizados mediante el uso de plaguicidas (cerca de 500 millones de kg de ingredientes activos a nivel mundial), el rendimiento de los cultivos alcanza porcentajes del 20% al 30% de pérdidas (Espinoza y Vallejos, 2016).

Por ejemplo, en la provincia de Jianxi, China, han perdido más del 25% de sus arboledas, en Brasil, 52,6 millones de naranjos dulces han tenido que ser eliminados, ocasionando una reducción del 31% de la producción y en Florida EE. UU en 4 años provocó 10% de pérdidas en la capacidad de producción y más de 6.600 puestos de trabajo (Candela Ferre, 2020). Así mismo, en los principales municipios productores de Tamaulipas México se menciona un daño estimado de 2500 ha con la detección positiva de la bacteria *Candidatus liberibacter asiaticus* (Zapata et al., 2022).

Entre el año 2015 y 2017 en Colombia, se detecta por primera vez la bacteria en el insecto vector y se confirmó la presencia de *Candidatus liberibacter asiaticus* en tejido de limón criollo de traspatio en el municipio de Valledupar, exactamente en el corregimiento de Patillal (Resolución 1972, 2017), constituyéndose el primer reporte del HLB en este país, desde entonces para el año 2019 se han detectado casos positivos en 40 municipios de los departamentos de Atlántico, Bolívar, César, La Guajira, Magdalena, Norte de Santander, Córdoba y Sucre (ICA, 2019). Por lo que, se declara el estado de emergencia fitosanitaria en todo el territorio nacional (Resolución 2390, 2015), y en cuarentena fitosanitaria el Departamento de La Guajira para el año 2016 (Resolución 4713, 2016).

Sin embargo, la ejecución de ensayos realizados para el control de tal fitopatología y el manejo integrado de *Diaphorina citri* en el departamento del Cesar es escasa, hay pocas investigaciones que permitan la obtención de resultados prometedores para la erradicación o la disminución de dicha enfermedad, constituyéndose en una problemática que, además, atenta con la seguridad alimentaria.

2.1. Formulación del problema

¿Cuál es la eficiencia de los hongos patógenos *Beauveria bassiana* y *Trichoderma sp.* en el control biológico del insecto plaga *Diaphorina citri* causante

de la enfermedad Huanglongbing en *Citrus limon* en el Parque la vallenata de la Ciudad de Valledupar - César?

3. JUSTIFICACION

El cultivo de cítricos es una fuente de empleo para muchos agricultores a nivel mundial, la búsqueda de métodos que garanticen una disminución de la incidencia de enfermedades en dichas plantas, también, es muy importante en este sector, ya que al tener controladas tales afectaciones se garantiza un crecimiento por parte de este sector en la economía, además de generar métodos para el buen Manejo Integrado de Plagas (MIP) y garantizar el adecuado manejo fitosanitario del cultivo de cítricos. Es decir, fomentar técnicas de control en las que se pongan de manifiesto características como, la prevención de la enfermedad y que esta sea amigable con el medio ambiente, que se pueda reproducir de forma masiva y en temas de costos sea asequible para todos los agricultores, el control biológico es uno de los métodos más usados en el manejo de plagas compatible con el ambiente, que ofrece tales beneficios. (Pacheco et. al, 2019).

El uso de enemigos naturales como depredadores, parasitoides y patógenos, hacen parte del control biológico que hoy día los expertos en la agroindustria fomentan, asimismo la microbiología, juega un papel importante en el uso de

tales patógenos, que incluyen una variedad de microorganismos, como bacterias, hongos, protozoos y virus, los cuales han mostrado ser efectivos controlando plagas, como ejemplo de ello tenemos que, los hongos como *Beauveria bassiana* que pueden causar enfermedades en los insectos, no contaminan el ambiente y no son tóxicos para el hombre y otros animales, mantienen la población de la plaga por debajo de los niveles de daño económico y la aparición de resistencia en los insectos hacia los patógenos es extremadamente baja, comparada con la alta probabilidad de adquirirla, si se usaran agroquímicos (ICA, 2015).

Por otro lado, *Trichoderma spp.* como antagonistas y promotores de crecimiento contribuyen a atenuar los daños que causan las enfermedades, ejerciendo diferentes modos de acción que les permiten mostrar su efecto como biorreguladores, y su capacidad de multiplicarse masivamente permite seleccionarlos como agentes de control biológico (Valdés, 2014).

Por tal razón, implementar este tipo de alternativas en la ciudad de Valledupar, se presenta como una posibilidad para mitigar la problemática de Huanglongbing de forma sustentable y amigable al medio ambiente, y es necesaria para evaluar qué tan eficiente es el control biológico del insecto vector *Diaphorina citri* mediante el uso de los hongos patógenos *Beauveria bassiana* y *Trichoderma spp.*

4. OBJETIVOS

4.1. General.

Evaluar la eficiencia de los hongos patógenos *Beauveria bassiana* y *Trichoderma sp.* como controladores biológicos de *Diaphorina citri*, vector de la enfermedad Huanglongbing en plantas de limón ubicadas en el parque La Vallenata en la ciudad de Valledupar - César.

4.2. Específicos.

- ✓ Medir el nivel de daño de la enfermedad HLB de los cítricos y el nivel de infestación de *Diaphorina citri* en el cultivo de limón.
- ✓ Calcular el porcentaje de patogenicidad *in vitro* de *Beauveria bassiana* sobre *Diaphorina citri* y el potencial antagónico de *Trichoderma sp.* en el cultivo de *Citrus limon* frente a la enfermedad del Huanglongbing.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Antecedentes

A nivel mundial los cultivos cítricos en los últimos años se han visto amenazados por una enfermedad transmitida por el insecto *Diaphorina citri*, denominada Huanglongbing, la cual no tiene cura, además su detección se basa en la inspección visual de los síntomas y la prueba de reacción en cadena de la polimerasa, y los esfuerzos por controlar dicha enfermedad están enfocados en el manejo y la vigilancia del vector, así como la delimitación de las áreas de riesgo, factores climáticos y estacionales, y la implementación de herramientas metodológicas que permitan la disminución del insecto en los cultivos, tales como, controles físicos, químicos y biológicos. Berger *et al.*, (2018), Garza *et al.*, (2017), Monzo *et al.*, (2015), Moncayo *et al.*, (2014), Mora *et al.*, (2014), Diaz-Padilla *et al.* (2014), Santivañez *et al.*, (2013). Palomares *et al.*, (2015) dieron a conocer en su estudio que *D. citri* presenta diferencias tanto en sus hábitos como en su ciclo biológico en estaciones de verano e invierno.

El esquema de manejo integral de cítricos dentro de sus estrategias para combatir el Huanglongbing han implementado el control del vector *Diaphorina citri*,

evaluando el comportamiento de este insecto en diferentes ventanas climáticas cuando se le aplica control biológico con hongos entomopatógenos, dando porcentajes de mortalidad altos cuando dicho tratamiento es aplicado a temperaturas ambiente promedio de 30.8°C y humedad relativa de 50 a 93% (Lomas *et al.*, 2021). Candela Ferre (2020), afirma que a la fecha no existe cura ni resistencia comercial implementada para el HLB, por lo que el manejo recomendado es la identificación y eliminación de árboles infectados y un control exhaustivo del psílido, también, la utilización de árboles transgénicos, pero este es un proceso largo y costoso.

De igual manera, en un estudio realizado por Hussein *et al.*, (2018), examinaron la susceptibilidad de *D. citri* infectados y no infectados con *Candidatus liberibacter asiaticus* (Las) a los hongos entomopatógenos *Isaria fomesorozea* e *Hirsutella citriformis* en diferentes regímenes de temperatura (5 – 40°C), mostrando que adultos de *Diaphorina citri* son menos susceptibles a los hongos entomopatógenos a temperaturas frías en comparación con temperaturas de 27°C, también, afirman que hay una correlación en la susceptibilidad por parte de este insecto a los hongos entomopatógenos cuando el psílido se infecta con Las, mostrando un aumento en la susceptibilidad si el insecto se encuentra infectado con la bacteria.

Sin embargo, debido a la necesidad que surge actualmente por generar productos orgánicos, y la búsqueda de mecanismos ambientalistas, se retoma el control biológico en el manejo integrado de plagas, ya que, además de mantener el equilibrio ecológico en los cultivos, esta práctica promete ser amigable con el medio ambiente, selectiva, segura, económica en comparación al control químico y eficiente en el control de plagas. Cochrane y Shade., (2019), Pérez. (2018), Nicholls. (2008). Baron *et al.*, (2019) manifiestan en su revisión que los hongos son los microorganismos más estudiados y utilizados en el control biológico, por su eficiencia, diversidad, seguridad ambiental y por ser descomponedores. Además, Rodríguez *et al.*, (2020) en un experimento realizado con el hongo

Fusarium semitectum demostró la patogenicidad de este hongo sobre adultos de *D. citri*, con un porcentaje de mortalidad de 21,9 a 50,7% y al mismo tiempo demostró la inocuidad del hongo sobre *Chrysoperla externa* enemigo natural de este insecto plaga.

En un estudio realizado por Vallejos *et al.*, (2014) se concluyó que hongos como *Trichoderma inhamatum* y *Beauveria bassiana* poseen actividad insecticida y actividad enzimática quitinolítica, por lo que se recomienda su uso para el manejo de plagas. El género *Trichoderma*, presenta una gran versatilidad y adaptabilidad ha mostrado influencia en la promoción del crecimiento vegetativo e induce resistencia a fitopatógenos en las plantas con las que se asocia. López-Ferrer *et al.*, (2017), Valdés. (2014). Ullah *et al.*, (2018) evaluaron la patogenicidad de *Beauveria bassiana* e *Isaria fomesorosea* y en sus resultados evidenciaron el potencial de ambos hongos entomopatógenos para controlar el psílido adulto de los cítricos *D. citri* con un porcentaje de mortalidad del 64 al 74% en laboratorio y del 61 al 72 % en condiciones de semicampo, respaldando la efectividad de ambos hongos como biopesticidas para el manejo integrado de este insecto plaga.

Por consiguiente, Berlanga *et al.*, (2018), Ramos. (2016), Cruz. (2016), Pantoja *et al.*, (2014), Gandarilla *et al.*, (2013), identificaron y aislaron en sus bioensayos, a partir de ninfas y adultos muertos del insecto *Diaphorina citri*, hongos entomopatógenos, entre los cuales se mencionan, *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae*, *Hirsutella citriformis*, *Isaria javanica*, *Beauveria bassiana*, *Simplicillium lanosoniveum*, *Hirsutella citriformis* Speare, *Purpureocillium lilacinum*, *Paecilomyces formosus* y *Metarhizium brunneum*, quienes ponen de manifiesto la posibilidad de explorar el potencial de estos microorganismos como biocontroladores del psílido vector de la enfermedad Huanglongbing, con una tasa de mortalidad comprendida entre el 64 al 84%. (Chiriboga *et al.*, 2015), Dentro de los Hongos mencionados anteriormente cabe resaltar que, *Beauveria*

bassiana es un hongo eficiente con la eliminación de diversas plagas. Malpartida *et al* (2013).

Los hongos entomopatógenos prometen ser una buena alternativa en el control biológico de plagas, en este caso de acuerdo a Rodríguez *et al.*, (2018), una estrategia para el control del psílido asiático *Diaphorina citri*, consiste en el uso de hongos entomopatógenos. Esto acarrea el uso de productos elaborados a partir de microorganismos u otros recursos naturales. Arora *et al.*, (2017), mencionan, algunos de estos productos, como son, bioplaguicidas elaborados a partir de los hongos *Trichoderma viride* y *Beauveria bassiana*, concluyendo que estos productos son completamente biodegradables y disminuyen el riesgo de cáncer a diferencia de los químicos.

5.2. Marco conceptual.

5.2.1. Huanglongbing

El Huanglongbing o HLB es una enfermedad que afecta diversas especies de las plantas del género *Citrus*, originaria de Asia, siendo actualmente considerada como la enfermedad más devastadora de los cítricos a nivel mundial, debido a los daños que causa, a la dificultad de su diagnóstico y a la velocidad de su expansión (Santivanez *et al.* 2013). A la fecha, no se cuenta con un tratamiento efectivo para la detección de esta enfermedad, que pueda ayudar a disminuir su propagación y la consecuente eliminación de árboles infectados (Garza *et al.*, 2017).

Para que el HLB se disperse es necesario que exista la relación hospedante-vector-inóculo. Los hospedantes son todas las plantas pertenecientes a la familia *Rutaceae*, entre ellas los cítricos; los vectores son los psílicos

Diaphorina citri y *Trioza erytreae*; el inóculo son las especies de bacterias dentro del género *Candidatus Liberibacter* (Berger et al., 2018).

5.2.2. Hospedantes

Afecta severamente a naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y cítricos agrios, como lima mexicana (*Citrus aurantifolia*) y lima persa (*Citrus latifolia*). Las afectaciones son menores o inexistentes en naranja trifoliada (*Poncirus trifoliata*) y sus híbridos, así como en pomelo (*Citrus paradisi*). Los tejidos de la planta más susceptibles al HLB son los tejidos jóvenes, debido a que es en estos donde el vector prefiere realizar su alimentación (Santivañez et. al, 2013).

5.2.3. Agente causal.

El HLB es causado por bacterias gramnegativas del género *Candidatus Liberibacter*: denominado *Candidatus*, por pertenecer al tipo de microorganismos que no es posible cultivar en el laboratorio con las técnicas tradicionales, lo que dificulta su caracterización y clasificación. El nombre *Liberibacter* es una palabra compuesta, proveniente de dos vocablos del latín *liber* (corteza) y *bacter* (bacteria). Se reconocen tres tipos causantes de esta enfermedad: *Candidatus liberibacter asiaticus*, *Candidatus liberibacter africanus* y *Candidatus liberibacter americanus*. Estas bacterias son introducidas por un organismo vector en el floema de la planta hospedera, y al moverse, a través del sistema vascular, la contaminan en su totalidad, causando su muerte después de 2 a 3 años (Garza et al., 2017).

De acuerdo con la FAO. (Santivañez et. al, 2013), las diferentes especies de *Candidatus* presentan las siguientes características:

- *Candidatus liberibacter asiaticus*, tolerante al calor y distribuida en países de Asia y América donde la enfermedad está presente.
- *Candidatus liberibacter africanus*, sensibles al calor, con la subespecie “capensis”.

- *Candidatus liberibacter americanus*, no es tolerante al calor y solo se ha encontrado en el estado de Sao Paulo, Brasil.

5.2.4. Vector

La transmisión natural ocurre a través de los vectores *Trioza erytrae* Del Guercio, y *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: *Liviidae*). Las bacterias también se transmiten a través de injerto, mientras que la transmisión por semillas no se ha demostrado (Pantoja et al., 2014).

5.2.5. *Trioza erytrae*

Según Monzo et al. (2015) *Trioza erytrae* es un psílido de origen africano que se describió inicialmente como una mosca blanca, *Aleurodes erytrae* Del Guercio 1918. Éste forma parte de un grupo de diez especies que son difíciles de separar morfológicamente pero que se alimentan de especies de plantas huéspedes diferentes y transmite la bacteria *Candidatus liberibacter africanus*. *Trioza erytrae* se desarrolla sobre las plantas *Clausena anisata* (Willd.) Oliv. (=Clausena inaequalis (DC.) Benth.), *Citrus spp.*, *Vepris undulate* (Thunb.) Verdoorn & C.A. Smith (=Toddalia lanceolata Lam.) y *Fagara spp.*

Este insecto tiene una longevidad de adulto de 30 días, presenta 5 instares ninfales, como adulto mide 4 mm y de 1,3 a 1,5 mm como ninfas, oviposita 2000 huevos en toda su vida, los cuales son colocados en la epidermis de las hojas, su ciclo de vida dura alrededor de 17 a 43 días y, su temperatura óptima de desarrollo es de 20 - 24 °C (Santivañez et. al, 2013). Este género presenta tres bifurcaciones del ala (radius, media y cubitus) en el mismo punto, además, las ninfas de *T. erytrae* al alimentarse del tejido vegetal producen agallas en forma de abultamientos cóncavos desde el envés de las hojas (Monzo et al., 2015).

5.2.6. *Diaphorina citri*.

El psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: *Liviidae*), es actualmente la plaga más importante de los cítricos. Transmite las

bacterias *Candidatus liberibacter asiaticus* y *C. I. americanus* (Palomares et al., 2015). Moncayo et al., (2014) dice que el insecto causa daños directos, al alimentarse de la planta e indirectos cuando transmite la bacteria causante de la enfermedad. Principalmente, ataca los flujos jóvenes de cítricos y también puede atacar a los cítricos estresados, si la población es alta. Tanto las ninfas como los psílidos adultos se alimentan directamente del floema de los tejidos y causan el crecimiento distorsionado de las plantas, así como la muerte por brote (Ullah et al., 2018).

Este insecto es más tolerante al calor y al clima seco, desarrollándose óptimamente en temperaturas de 25 a 28 °C. Tiene un período de vida corto y una fecundidad alta. Las hembras tienen un período de oviposición de 12 días y son capaces de depositar hasta 800 huevos en el transcurso de su vida. Los huevos eclosionan a los tres días en verano y a los 23 días en invierno. El ciclo completo es de 15 a 47 días, y puede presentar hasta 10 generaciones por año, consta de cinco instares ninfales una vez eclosionados los huevecillos, estas varían de tamaño entre 0,3 y 1,6 mm de longitud, dependiendo del instar, son de color anaranjado amarillo, sin manchas abdominales, aplanadas dorso ventralmente, con esbozos alares (alas pequeñas en formación) abultados, un par de ojos rojos compuestos, dos antenas de color negro y presentan filamentos a lo largo del abdomen (Santivañez et. al, 2013).

Los huevos de *D. citri* son ovipositados por la hembra verticalmente en los ápices de los cogollos o en los primordios y la oviposición está condicionada a la presencia de brotes, La fecundidad de las hembras depende del hospedero y la temperatura, Las ninfas excretan filamentos cerosos de color blanco a manera de hilos que salen del extremo abdominal y los adultos tienen poca capacidad para sostener vuelos muy largos, pero pueden ser transportados a grandes distancias por corrientes de aire (Ramos, 2016).

5.2.7. Distribución geográfica

El insecto vector *D. citri* está ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales de Asia. A principios de 1998, fue descubierto en la isla de Guadalupe en el Caribe y luego en Argentina, Paraguay, Uruguay, Brasil, Venezuela, Colombia y México. También, se encontró en la Florida y con alta probabilidad de dispersarse hacia los cítricos de Louisiana, Texas, Arizona y California (Moncayo et al., 2014), mientras que Monzo et al., (2015) reporta en su investigación que el psílido africano de los cítricos *Trioza erytreae* ha sido detectado recientemente en el norte de la Península Ibérica (Portugal y Galicia).

La primera detección de HLB en el Continente Americano fue en el año 2004, en el estado de Sao Paulo, Brasil. Desde su confirmación en Florida, E.U.A., en 2005, la dispersión de la enfermedad y su vector a través del Caribe, América Central y del Norte, ha sido considerablemente rápida. Las pérdidas por efectos de esta enfermedad son cuantiosas; tan solo en África y Asia, causó la muerte de 60 millones de árboles (Díaz et al., 2014).

En cuanto a Colombia, de acuerdo al Ministerio de Agricultura. (2019), actualmente, el HLB de los cítricos se encuentra en los departamentos de Atlántico, Magdalena, Cesar, Bolívar, La Guajira y Norte de Santander. Los hospedantes que afectan esta enfermedad son: limón común o pajarito, lima ácida Tahití, pomelo, naranja, mandarina, toronja. Por otro lado, esta bacteria ataca las plantas de mirto o azahar de la india y de swinglea, especies que son utilizadas como plantas de traspatio y cercos vivos.

5.2.8. Sintomatología

La identificación temprana de síntomas de HLB en los árboles cítricos se considera un factor clave, ya que permite ejecutar rápidamente medidas de control para evitar la propagación de la enfermedad. Los indicios de HLB se pueden observar en ramas, frutos y hojas de un árbol cítrico, estos síntomas son

similares para los distintos agentes infecciosos, como así también para las distintas especies de cítricos (Berger et al., 2018).

Los árboles gravemente afectados tienen manchas moteadas en hojas, hojas más pequeñas con algunos síntomas de deficiencia de nutrientes, así como venas de color amarillo. Además, las frutas infectadas con HLB muestran colores anormales, formas irregulares, sabor amargo y presentan semillas abortadas. Estos síntomas pueden utilizarse para el diagnóstico de la enfermedad, pero son imprecisos, por lo que se requiere su confirmación (Garza et al., 2017).

5.2.9. **Control**

Las estrategias de control de esta enfermedad están encaminadas a la relación existente entre vector y agente causal, teniendo en cuenta que este último no se ha podido cultivar en laboratorio, las medidas para disminuir el HLB de los cítricos se centran en los vectores *D. citri* y *T. erytrae*. Hoy día tales medidas se encuentran en el control químico, físico y biológico.

5.2.10. **Control químico y físico**

Considerando el riesgo de la enfermedad y su vector, se recomienda como estrategias controlar las poblaciones del PAC con insecticidas sintéticos, eliminar árboles enfermos y realizar siembra de plantas libres de enfermedades. El control químico constituye una importante herramienta para reducir la población de *D. citri*; sin embargo, las aplicaciones foliares dirigidas al control de adultos y ninfas proporcionan un periodo corto de protección y tienen un efecto nocivo sobre la entomofauna benéfica (Berlanga et al., 2018).

5.2.11. **Control biológico**

En el contexto actual, que exige aumento de la oferta de alimentos conservando los recursos naturales, la estrategia de gestión regional del HLB debe estar alineada con el paradigma de Incremento Sostenible de la Producción Agrícola (ISPA) (Santivañez et. al, 2013). Según Berlanga et al. (2018), para limitar la

dispersión del HLB y disminuir la densidad poblacional de *D. citri* se requiere de un esquema de manejo integrado, ya que el uso continuo de insecticidas químicos puede originar la selección de psílicos resistentes.

El control biológico puede definirse como el uso de organismos benéficos (enemigos naturales) contra aquellos que causan daño (plagas). Un organismo indeseable puede eliminarse localmente o, lo que resulta mejor, su población puede reducirse a una escala que no cause daño económico (Nicholls, 2008). Si bien esta estrategia no es una técnica innovadora ni moderna, los especialistas coinciden en que se trata de una alternativa beneficiosa y en auge que permite reducir el uso de insumos químicos y bajar, así, la contaminación ambiental (Pérez, 2018).

5.2.12. Enemigos naturales

Los agentes de control biológico de *D. citri* reportados son varios artrópodos depredadores y parasitoides, además de la infección natural de diferentes especies de hongos entomopatógenos (HE) como *Hirsutella citriformis* Speare, *Isaria fumosorosea* (\equiv *Paecilomyces fumosoroseus*), *Isaria javanica* (\equiv *Paecilomyces javanicus*), *Lecanicillium lecanii* (\equiv *Verticillium lecanii*) y *Beauveria bassiana*.

5.2.13. Aplicación de los hongos en el control biológico.

Las especies fúngicas que se usan en el control biológico incluyen hongos basales y superiores. Entre los hongos basales, hay representantes del filo *Blastocladiomycota*, como *Coelomomyces*, y del subfilo *Entomophthoromycotina*, como las especies de los géneros *Conidiobolus*, *Entomophthora*, *Erynia* y *Entomophaga*. Entre los hongos superiores, varias especies del filo Ascomycota (Subkingdom Dikarya) han reportado potencial y se comercializan y aplican en el campo, como *Purpureocillium*, *Metarhizium*, *Beauveria*, *Cordyceps*, *Fusarium*, *Trichoderma* y otros (Baron et al., 2019).

Los hongos entomopatógenos son herramientas notables y prometedoras para el manejo efectivo de las plagas de insectos debido a la fácil producción en masa, además de infectar varias etapas de la vida del huésped insecto a través de su cutícula (Ullah et al., 2018).

5.2.14. ***Beauveria bassiana***

Los hongos como *Beauveria bassiana* que pueden causar enfermedades en los insectos, son llamados entomopatógenos. Viven naturalmente en el ambiente, suelos o en agua, como así también alojados en los mismos cuerpos de los insectos, causando su muerte en un plazo aproximado de cinco a siete días; con la posibilidad de propagar la enfermedad a otros insectos bajo condiciones favorables de temperatura y humedad (Chiriboga et al., 2015).

Vallejos et al., (2014) dicen que el empleo de microorganismos como los hongos entomopatógenos, caracterizados por su capacidad biocontroladora sobre insectos, ha cobrado importancia en los últimos años, debido a que estos microorganismos se caracterizan por su producción de metabolitos secundarios y enzimas tales como: proteasas, celulasas, xilanasas, pectinasas, amilasas, quitinasas, etc. De acuerdo a Baron et al., (2019) los hongos entomopatógenos mejor caracterizados y más empleados en los programas de control biológico son *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. Son dos especies cosmopolitas y saprófitas que se pueden encontrar en casi todos los ecosistemas, es decir, son patógenos facultativos que no requieren un artrópodo como huésped para completar sus ciclos de vida.

5.2.15. ***Trichoderma spp.***

El género *Trichoderma* es un hongo cosmopolita, habitante natural del suelo que se presenta en diferentes zonas y hábitat, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos, especialmente en aquellos que son atacados por otros hongos. Algunas de sus especies tienen la habilidad de producir enzimas que atacan o inhiben a hongos fitopatógenos y que lo convierten en un excelente

agente de biocontrol. Además, son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidos por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Valdés, 2014).

Se han descrito alrededor de 40 taxones de *Trichoderma* spp., hasta la fecha de los cuales más de 20 se han descrito para usos agrícolas (López et al., 2017).

5.3. Marco legal

Resolución N° 00375: Por la cual se dictan las disposiciones sobre Registro y Control de los Bioinsumos y Extractos Vegetales de uso agrícola en Colombia. Que de acuerdo con el Decreto 1840/94, le corresponde al Instituto Colombiano Agropecuario ICA otorgar el registro y ejercer el control legal y técnico de los Bioinsumos y Extractos Vegetales de uso agrícola en el país.

Decreto N° 1843: Por el cual se reglamentan parcialmente los títulos III, V, VI, VII y XI de la ley 09 de 1979, sobre uso y manejo de plaguicidas.

Resolución N° 3079: Por la cual se dictan disposiciones sobre la industria, comercio y aplicación de bioinsumos y productos afines, de abonos o fertilizantes, enmiendas, acondicionadores del suelo y productos afines; plaguicidas químicos, reguladores fisiológicos, coadyuvantes de uso agrícola y productos afines.

Resolución N° 00001668: Por medio de la cual se declara la enfermedad Huanglongbing de los cítricos y su vector *Diaphorina citri* Kuwayama como plagas de control oficial y se establecen las medidas fitosanitarias para su manejo y control.

6. METODOLOGÍA

6.1. Tipo de estudio y línea de investigación

El estudio realizado es de tipo experimental, encaminado en la línea de investigación de bioprospección de Microbiología de la Universidad Popular del Cesar.

6.2. Área de estudio

El desarrollo experimental de este proyecto a nivel de campo se llevó a cabo en el Parque La Vallenata ubicado en la zona urbana de la ciudad de Valledupar, con latitud 10,4489° o 10° 26' 56" norte y longitud -73,263° o 73° 15' 47" oeste, según Mapcarta. Esta área es un campo so de la Universidad Popular del Cesar. (ver figura 1).



Figura 1. Representación del área de estudio.

Fuente: (Google Maps, 2023).

Población de estudio.

Para la ejecución de esta investigación se tomó como población de estudio árboles de limón (*Citrus limon*) de 3 a 5 años de edad con sintomatología presuntiva de HLB, tal como manchas irregulares de color amarillo en las hojas, engrosamiento y aclaración de las nervaduras (Berger), al igual que frutos deformes, pequeños y con pobre coloración o el desprendimiento de esta con semillas necrosadas. De igual manera, se incluyó dentro de la población a

estudiar al psílido adulto de los cítricos (PAC) *Diaphorina citri*, con características morfológicas tales como, alas moteadas de color castaño, antenas pequeñas con punta de color negro y tamaño de 2,30 mm de largo x 0.65 mm de ancho (Varón Devia., 2020)

6.3. Técnicas de obtención de datos.

6.3.1. Inspección y visualización del área de estudio.

Se llevó a cabo una inspección visual del área de estudio, y se ingresó al cultivo de limón, permitiendo la revisión de las plantas e indicios de la enfermedad, como síntomas y presencia del insecto vector, durante toda la inspección se guardó registro fotográfico. Se hizo un esquema de la zona, registrando la distribución geográfica de la población de estudio.

6.3.2. Instrumentos de medición para la toma de datos.

Teniendo en cuenta las variables a cuantificar se emplearon los siguientes instrumentos para la toma de datos, cámara para el registro fotográfico, cinta métrica, hojas de papel, lápices, bolígrafos, planillero plástico.

6.3.3. Muestra (n).

Se tomaron 11 plantas de *Citrus sp.* afectadas por el insecto vector *Diaphorina citri* con características presuntivas de la enfermedad en estudio.

6.3.4. Tipo de muestreo.

Para el desarrollo experimental de este estudio se empleó el tipo de muestreo no probabilístico por conveniencia, es decir, se tomaron las muestras de los insectos y del material vegetal en sitios seleccionados al azar por un periodo de tiempo determinado.

6.3.5. Material biológico.

Las cepas de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma* fueron suministrados del cepario del laboratorio de investigación de Parasitología y Agroecología Milenio (PAM) ubicado en la Universidad Popular del Cesar.

6.4. Diseño metodológico.

6.4.1. Determinación del nivel de daño por Huanglongbing (HLB)

Para la cuantificación del nivel de daño se tuvo en cuenta la técnica empleada por Flores et al., (2015) donde se midió el porcentaje de severidad y la severidad total de la enfermedad por número de árboles con escala aritmética por variables morfológicas en hojas, como se especifica a continuación.

6.4.2. **Porcentaje de Severidad (%Sev):** se dividió el dosel de cada árbol en 4 secciones de 25%, como se representa en la (Figura 2).



Figura 2. Representación del dosel arbóreo o copas de los árboles dividido en las 4 secciones.

Fuente: (Angarita & Ureche, 2023).

Seguidamente se tomó registro fotográfico de 5 hojas con lesiones características de la enfermedad de cada uno de los árboles en estudio y, con ayuda de la aplicación ImageJ, (2015) se llevó a cabo de forma sistematizada la cuantificación del porcentaje de severidad, con esta información se hizo la comparación de los resultados obtenidos con la escala de severidad total obteniendo la clasificación del nivel de daño de las plantas.

Clases	0	1	2	3	4
Nivel de severidad	Sano	25%	50%	75%	100%

Tabla No. 1 escala de severidad total

Evaluación del nivel de severidad o daño por variables morfológicas en hojas.

Clase 1: Moteado difuso y manchas angulares.

Clase 2: Manchas angulares y puntos cloróticos.

Clase 3: Engrosamiento y acorchamiento de la nervadura.

Clase 4: Amarillamiento generalizado de la lámina foliar.

6.4.3. Análisis estadístico.

Consistió en un diseño con 5 bloques cada uno con su respectivo tratamiento y 11 árboles en total, distribuidos en, (T1=*Beauveria bassiana*) 3 árboles, (T2=*Trichoderma spp.*) 2 árboles, (T3=*Beauveria bassiana* + *Trichoderma spp.*) 2 árboles, (T4=Control químico) 3 árboles y 1 árbol como testigo (T0) con ramas sintomáticas para cada una de las muestras a convenir de hojas. Posteriormente, se hizo análisis con ANOVA y comparación de medias con Duncan (F=0.05) de los resultados obtenidos.

6.4.4. Identificación y determinación del nivel de infestación de *Diaphorina citri*.

Este procedimiento se llevó a cabo con la metodología propuesta por Ullah et al., (2018) y Varón Devia., (2020).

Para la identificación del insecto adulto de *Diaphorina citri* se tomó registro fotográfico del insecto con la aplicación Lupa en aumento 4x, observando sus rasgos morfológicos y se compararon con claves ilustradas. Habiendo dividido el área de cultivo de *Citrus limon* en bloques, con el número de árboles por conveniencia, se tomó una rama por cada punto cardinal de cada árbol para la

toma de muestra, y se procedió a contar los adultos de *Diaphorina citri* que eran visualizados, cuantificando el nivel de infestación.

6.4.5. Análisis estadístico.

Consistió en un diseño con 5 bloques cada uno con su respectivo tratamiento y 11 árboles en total, distribuidos en (T1=*Beauveria bassiana*) 3 árboles, (T2=*Trichoderma spp.*) 2 árboles, (T3=*Beauveria bassiana* + *Trichoderma spp.*) 2 árboles, (T4=Control químico) 3 árboles y 1 árbol como testigo (T0), con 4 ramas a convenir para las muestras. Posteriormente, se hizo análisis con ANOVA y comparación de medias con Duncan (F=0.05) de los resultados obtenidos.

6.4.6. Preparación y aplicación de los bioinsumos a base de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma*.

Para este inciso se siguió la metodología de Espinoza y Vallejos (2016), en donde utilizaron arroz como sustrato para la multiplicación de los hongos.

6.4.7. Multiplicación de los hongos.

Empleando botellas de 200 ml, se realizó la precocción de 30 gr de arroz, con 50 ml de agua potable a baño de maría por 25 min, luego se inocularon los hongos *Beauveria bassiana* y *Trichoderma*. y se incubó a temperatura de 24 a 28 °C.

6.4.8. Solución madre y recuento en cámara de Neubauer.

A partir de cultivos puros de *B. bassiana* y *Trichoderma* se procedió a desprender los hongos del arroz, adicionando agua destilada a las botellas y con ayuda de una varilla limpia, se agito hasta desprender los hongos por completo del arroz, posterior a ello, se filtró en un recipiente de 2L con un colador y así se obtuvo la solución madre. Se tomó 1 ml de la solución madre y se agregó a 9 ml de agua destilada, hasta que se obtuvo una dilución de 10^{-10} para *B.bassiana* y hasta 10^{-15} para *Trichoderma spp.*, para facilitar el recuento de conidios para cada una de las cepas en cámara de Neubauer. Las suspensiones en los tubos se agitaron para su homogeneización. Los recuentos de la conidias se llevaron a cabo en los 4

cuadros de las esquinas de la cámara y el cuadro central, para hacer el cálculo de la concentración de células viables/ml utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Número de } \frac{\text{conidias}}{\text{gramo}} = \text{N}^{\circ} \text{ de conidias} \times \text{factor de cámara} \times \text{factor de dilución}$$

6.4.9. Prueba de patogenicidad en laboratorio.

El bioensayo de laboratorio se realizó de acuerdo con la metodología de Ullah *et al.*, (2018), Se recolectaron 36 muestras de psílicos adultos vivos de las plantas a tratar y se colocaron 3 insectos en frascos de vidrio por cada repetición, se cerraron con tela a base de polipropileno permitiendo la entrada de oxígeno, en 3 atomizadores de plástico previamente lavados y desinfectados, se vertieron las suspensiones de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma spp.*, y el agua destilada. Finalmente, se aplicaron los tratamientos como se especifica a continuación.

	T1	T2	T3	T0
	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Trichoderma spp.</i>	<i>B. bassiana + Trichoderma spp.</i>	Agua destilada (Control)
R1	3 insectos	3 insectos	3 insectos	3 insectos
R2	3 insectos	3 insectos	3 insectos	3 insectos
R3	3 insectos	3 insectos	3 insectos	3 insectos

Tabla 2. Tratamientos para aplicar en prueba de patogenicidad en laboratorio.

Los datos de mortalidad fueron registrados cada 3 horas, fue un experimento completamente al azar.

6.4.10. Aplicación de los bioinsumos en campo.

Con la zona delimitada previamente en bloques y teniendo en cuenta el protocolo mencionado por Chiriboga *et al.*, (2015), se tomaron las suspensiones madres de cada hongo que previamente fueron preparadas en laboratorio y estando en campo se traspasaron a una bomba de aspersion, llevando cada suspensión a 10 L con agua y se prosiguió a la aplicación de los tratamientos a cada bloque correspondiente, realizando en total 4 aplicaciones cada 7 días en horarios crepusculares (antes de 10:00 a.m. o después de 4:00 p.m.), con poco viento,

evitando mezclar con productos químicos y se dejó un testigo al cual no se le aplicó ningún tratamiento.

6.4.11. Tratamientos aplicados en campo.

Se aplicaron 4 tratamientos (T0=Testigo, T1=Beauveria bassiana, T2=Trichoderma, T3=Beauveria + Trichoderma y T4=Sulfoxaflor) en un total de 10 árboles y 1 árbol como testigo, como se relaciona en el siguiente esquema

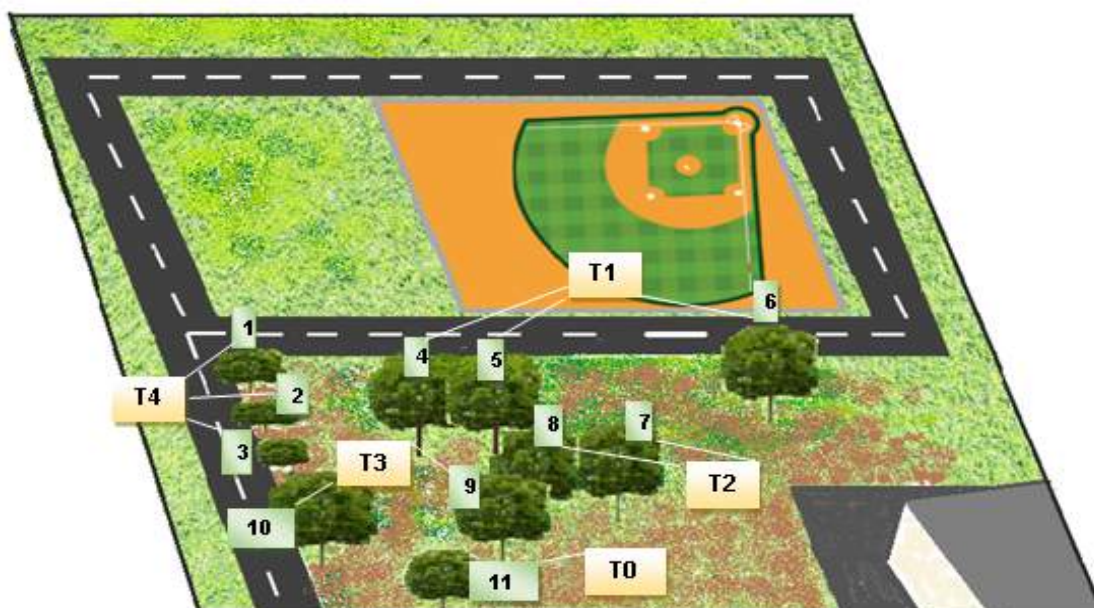


gráfico.

Figura 3. Representación de los tratamientos aplicados en campo.

Fuente: (Angarita & Ureche, 2023).

6.4.12. Potencial de *Trichoderma spp.* en la disminución del Nivel de Daño Económico (NDE) frente a la enfermedad del Huanglongbing en plantas de *Citrus limon*.

Para este procedimiento se tuvo en cuenta la metodología de Andrade et al., (2019) con algunas modificaciones.

La prueba se realizó *in situ*, aplicando una suspensión de *Trichoderma sp.* a una concentración de $7,0 \times 10^{22}$ conidios/mL con un aspersor sobre las raíces, tallos y hojas a 2 plantas de la población estudio (Árbol 7 y 8) con sintomatología presuntiva de la enfermedad Huanglongbing, es decir, plantas posiblemente

infectadas con la bacteria *Candidatus liberibacter*, el procedimiento se realizó 4 veces por un periodo de 4 semanas. Finalmente se midió el potencial antagonico por los datos obtenidos en el Nivel de daño y porcentaje de severidad de los Árboles.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Identificación de *Diaphorina citri* en las plantas de limón.

En la inspección realizada al área de estudio se encontraron en total 11 plantas de limón con sintomatología presuntiva de la enfermedad Huanglongbing, y se identificó en todos los Árboles la presencia del insecto vector *Diaphorina citri*, con

ayuda de claves ilustradas tomadas de Berger *et al.*, (2018) y con la aplicación Lupa (Lente de aumento con luz) versión 1.1.1., (2019) para Android se tomaron registros fotográficos.

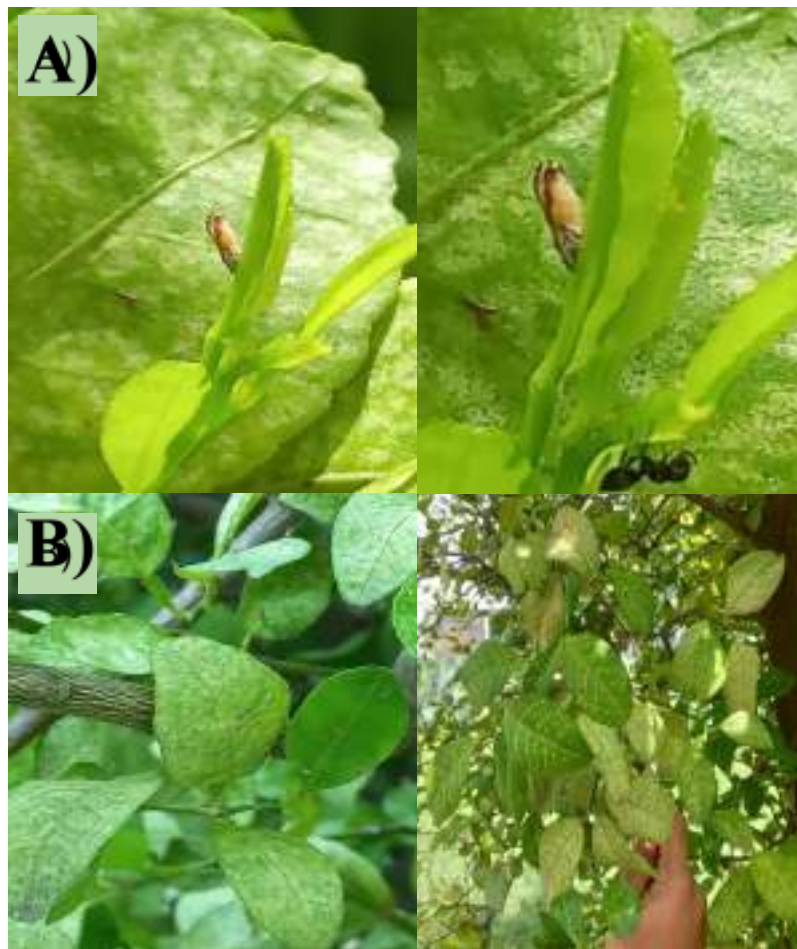


Figura 4. Inspección del área de estudio, A). Presencia del insecto vector *Diaphorina citri*, B). Presencia de sintomatología presuntiva de Huanglongbing.

Fuente: (Angarita & Ureche, 2023).

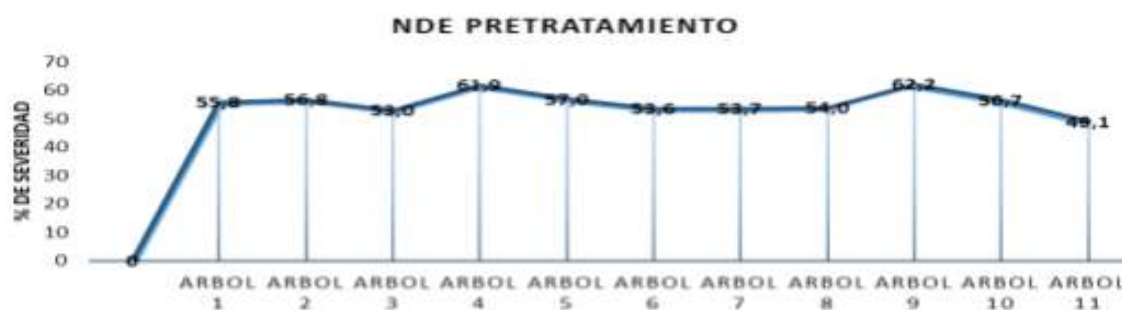
7.2. Determinación del Nivel de Daño Económico (NDE) por el Huanglongbing (HLB).

Al contrastar (Threshold color/Color de umbral) el área afectada de las 5 hojas fotografiadas al azar por Árbol y analizarlas en la aplicación ImageJ, (2015) (Ver Anexo E), se obtuvo el porcentaje de severidad de cada muestra pre y postratamiento, a los registros compilados se les hizo prueba de ANOVA con el

software IBM SPSS Statistics versión 29.0.1 (IBM, 2023), dando cálculos de medias entre 49 y 62% de severidad sin diferencia significativa ($F > 0.05$) entre los grupos muestreados pretratamiento (Ver Anexo). Los Árboles 1 al 10 se clasificaron en un Nivel de Daño Económico Clase 2 y el Árbol 11 en Clase 1 en la escala de severidad de la enfermedad (Ver Tabla 1).

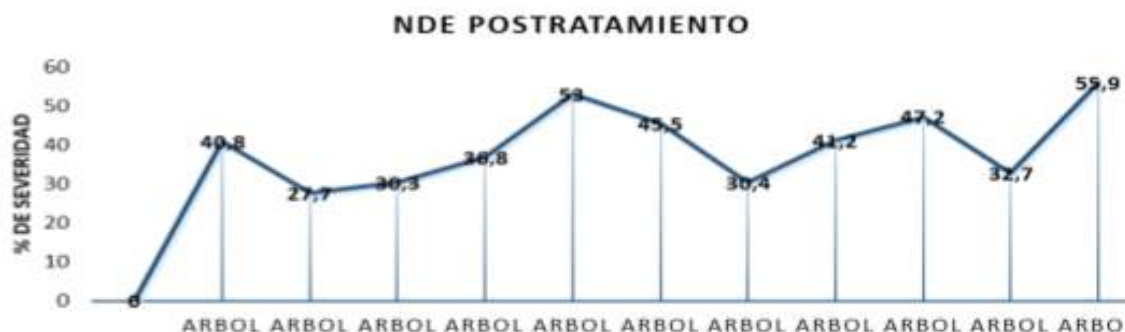
Al aplicar los diferentes tratamientos los Árboles presentaron una disminución en el NDE con porcentajes de severidad por debajo del 45% bajando al nivel 1 de daño, en comparación a los resultados de severidad obtenidos antes de aplicar los tratamientos, a excepción del Árbol 5, aunque, tuvo una disminución en el porcentaje de severidad, aún se mantuvo en un nivel de severidad Clase 2 y el Árbol 11 que no recibió tratamiento tuvo un incremento en su nivel de daño pasando de Clase 1 a 2.

La prueba ANOVA mostró diferencias significativas ($F < 0.05$) entre grupos y se evidencia que de los 10 Árboles tratados los que presentaron un menor porcentaje de severidad fueron el 2, 3, 7, 10 y 4 consecutivamente, entre un 27% y 38% (Ver Gráfica 2). Así mismo se hicieron pruebas Post hoc Duncan



Gráfica 1. Porcentaje de severidad pretratamiento

mostrando que T4, T2 y T3 lograron mejores resultados en cuanto al Nivel de Daño de las plantas y homogeneidad en sus resultados (ver Tabla 3).



%SEVERIDAD POSTRATAMIENTO					
Árbol 2	27,7	a	T4	32,9	a
Árbol 3	30,3	a	T2	35,8	a
Árbol 7	30,4	a	T3	39,9	ab
Árbol 10	32,7	ab	T1	45,1	b
Árbol 4	36,8	abc	T0	55,9	c
Árbol 1	40,8	bcd	Duncan *a*b		
Árbol 8	41,2	bcd	*a. Utiliza la media armónica = 9,375 *b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Utiliza la media.		
Árbol 6	45,5	cde			
Árbol 9	47,2	def			
Árbol 5	53	ef			
Árbol 11	55,9	f			

Aksenov *et al.*, (2014) describen dos clases de técnicas para la detección de HLB que utilizan imágenes de hojas o de los árboles, una de color visible (RGB, del inglés Red, Green, Blue) y otra de combinaciones de imágenes del espectro electromagnético visible y no visible al ojo humano manifestando que debido a la dificultad que presenta la detección de la enfermedad, aún para el personal experto, son una opción viable cuando los recursos de equipo adicional no están disponibles. Flores *et al.*, (2015) en un estudio realizado con PCR sobre plantas de limón persa encontraron diferentes concentraciones de CLas y diferentes grados de severidad dando a conocer que la intensidad de los síntomas inducidos está en función de la concentración bacteriana, explicando que a mayor severidad

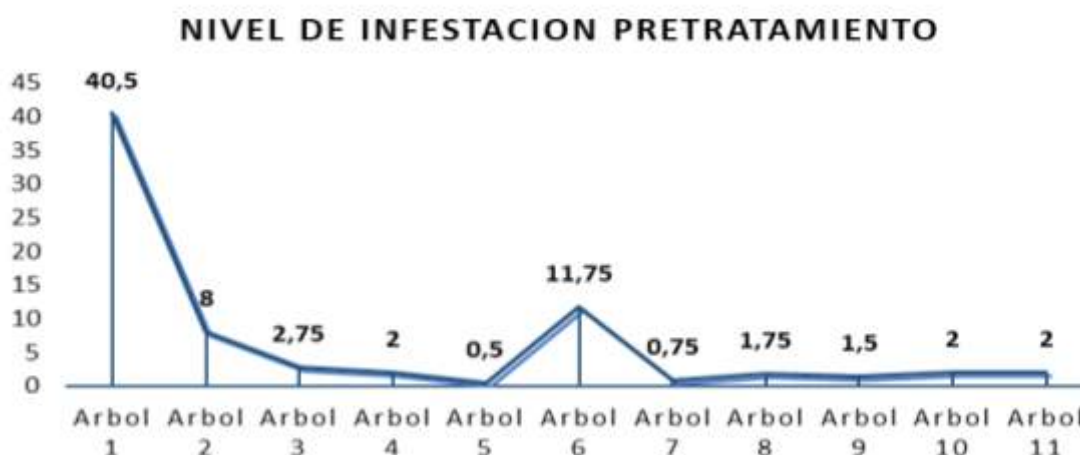
Tabla 3. Prueba de Duncan del NDE postratamiento $F = 0.05$

exista mayor efecto negativo en la producción de limón.

7.3. Determinación del nivel de infestación de *Diaphorina citri* pretratamiento y postratamiento

Se realizó análisis de varianza a los datos recolectados para la cuantificación del nivel de infestación pre y postratamiento dando diferencias significativas en ambos casos (Ver Anexo F). Antes de aplicar los tratamientos el nivel de infestación obtenido estuvo entre 0,5 y 40,5 de número de insectos por rama en las plantas de limón, siendo el Árbol 5 el de menor resultado y el Árbol 1 el de mayor (Ver Gráfica 3). Aplicados los tratamientos el rango en el nivel de infestación fue de 0 a 10, con un decrecimiento en el número de insectos por rama en los Árboles 2, 3, 8, 1 y 6, caso contrario para los Árboles 9, 7, 10, 5, 4 y 11 (Testigo) los cuales tuvieron un incremento (Ver Gráfica 4).

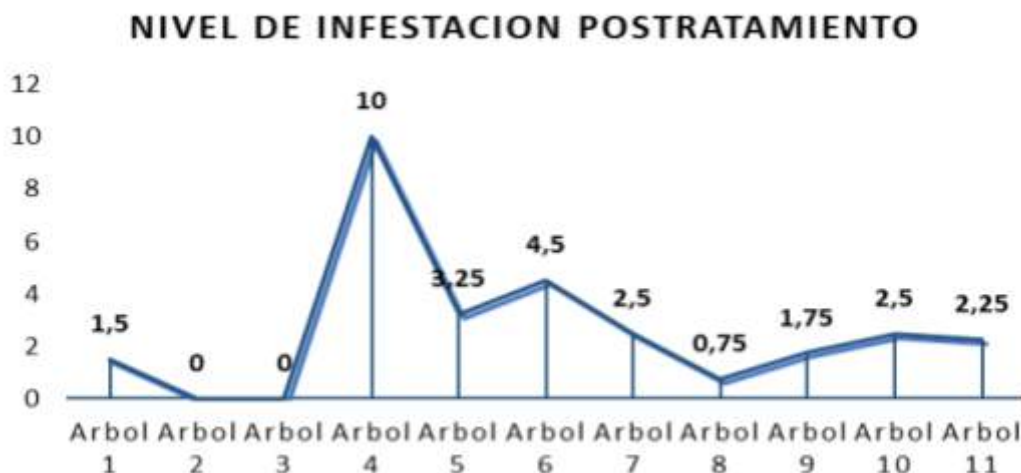
Las comparaciones en el test de Duncan para el nivel de infestación pretratamiento agrupo los resultados en 4 subconjuntos, destacando que los Árboles 5 y 7 tuvieron medias de 0,5 y 0,7 obteniendo los resultados más bajos y la mayoría de los Árboles (6 en total) fueron agrupados con medias de 1,5 a 2,75 (Ver Tabla 4). Postratamiento, los Árboles guardaron relación con resultados de media entre 0 y 4,5, a excepción del Árbol 4, perteneciente al bloque (T1= *Beauveria bassiana*), que obtuvo una media de 10 insectos por rama, categorizándose con el mayor nivel de infestación.



Gráfica 3. Nivel de infestación pretratamiento por Árbol.

NIVEL INFESTACION PRETRATAMIENTO			NIVEL INFESTACION POSTRATAMIENTO			NIVEL INFESTACION PRETRATAMIENTO			NIVEL INFESTACION POSTRATAMIENTO		
Árbol 5	0,5	a	Árbol 2	0	a	T2	1,25	a	T4	0,5	a
Árbol 7	0,7	a	Árbol 3	0	a	T3	1,75	a	T2	1,63	a
Árbol 9	1,5	a	Árbol 8	0,75	a	T0	2	a	T3	2,13	a
Árbol 8	1,75	b	Árbol 1	1,5	a	T1	4,75	a	T0	2,25	a
Árbol 4	2	a	Árbol 9	1,75	a	T4	17	b	T1	5,92	b
Árbol 10	2	b	Árbol 11	2,25	a	Duncan *a*b			Duncan *a*b		
Árbol 11	2	a	Árbol 7	2,5	a	*a. Utiliza la media armónica = 7,500			*a. Utiliza la media armónica = 7,500		
Árbol 3	2,75	b	Árbol 10	2,5	a						
Árbol 2	8	bc	Árbol 5	3,25	a	Tabla 4. Prueba de Duncan del Nivel de infestación pretratamiento y postratamiento. F=0.05					
Árbol 6	11,75	c	Árbol 6	4,5	a	*b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Utiliza la media.			*b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Utiliza la media.		
Árbol 1	40,5	d	Árbol 4	10	b						

Inicialmente, el bloque (T4= Sulfoxaflor) presento el mayor nivel de infestación con un promedio de 17 insectos por rama, el resto de grupos guardaron una relación con medias entre 1,25 a 4,75. Estos grupos tuvieron unas variaciones postratamientos, T4 tuvo una reducción de 0,5 número de insectos por rama, mientras que T2 (*Trichoderma sp.*) y T3 (*Trichoderma + Beauveria bassiana*) medias de 1,6 a 2,1 insectos por rama y T1 (*Beauveria bassiana*) hubo un incremento en el nivel de infestación, este bloque pasó de 4,75 a 5,92 número de insectos por rama.



Aunque, a nivel general la distribución de Árboles por tratamientos no tuvo la misma proporción, por conveniencia del ensayo, el bloque T4 si la tuvo con el T1 y T2 con T3. Cabe decir, que se esperaba un mejor resultado en el nivel de infestación de *Diaphorina citri* con respecto a las plantas tratadas con *Beauveria bassiana* esto se puede atribuir a la época del año en que se hizo el recuento del número de insectos pretratamiento finales de febrero y postratamiento mediados del mes de abril, Flores *et al.*, (2015) mencionan que marzo es la época favorable para la multiplicación de la bacteria y expresión de síntomas.

Factores ambientales como las precipitaciones son de relevancia ya que existe una relación de esto en la densidad poblacional del PAC, las cuales se presentaron de forma intermitentes pero abundantes a partir del mes de Abril mes en que se tomaron los datos postratamiento y en donde se evidencio nuevos brotes de hojas en las plantas favoreciendo las condiciones fenológicas para el desarrollo de los estados inmaduros del insecto, coincidiendo con lo obtenido en un estudio realizado por Alvarenga *et al.*, (2020).

El tratamiento químico tuvo los mejores resultados en disminuir el insecto, Ruiz *et al.*, (2015) hacen referencia a porcentajes de mortalidad en el uso de insecticidas para los adultos del PAC de hasta un 100% en el caso de activos a base de imidacloprid a las 48 horas de la aplicación. Por otra parte Brar *et al.*, (2016) en una prueba realizada obtuvieron que la mortalidad de adultos de *D. citri* después del tratamiento con Sulfoxaflor fue equivalente a la de imidacloprid, según los IC superpuestos en la CL₅₀ (metrog IA ml⁻¹) de 8,17 y 5,7 respectivamente. Por lo tanto, el control químico brinda mejor efectividad en la disminución del nivel de infestación, aunque no se debe descartar la posibilidad de ensayar con otros hongos entomopatógenos o concentraciones más elevadas de biopreparados de *Beauveria bassiana*.

7.4. Solución madre y recuento en cámara de Neubauer.

En el conteo de los conidios realizados por medio de la cámara de Neubauer, desarrollados con la fórmula: # de conidias x factor de cámara x factor de dilución, se obtuvieron los siguientes resultados;

Beauveria bassiana

Fd: 10^{-10}

11 colonias x 50000 x 10000000000

- *B. bassiana*= $5,5 \times 10^{15}$ conidios/mL

Trichoderma

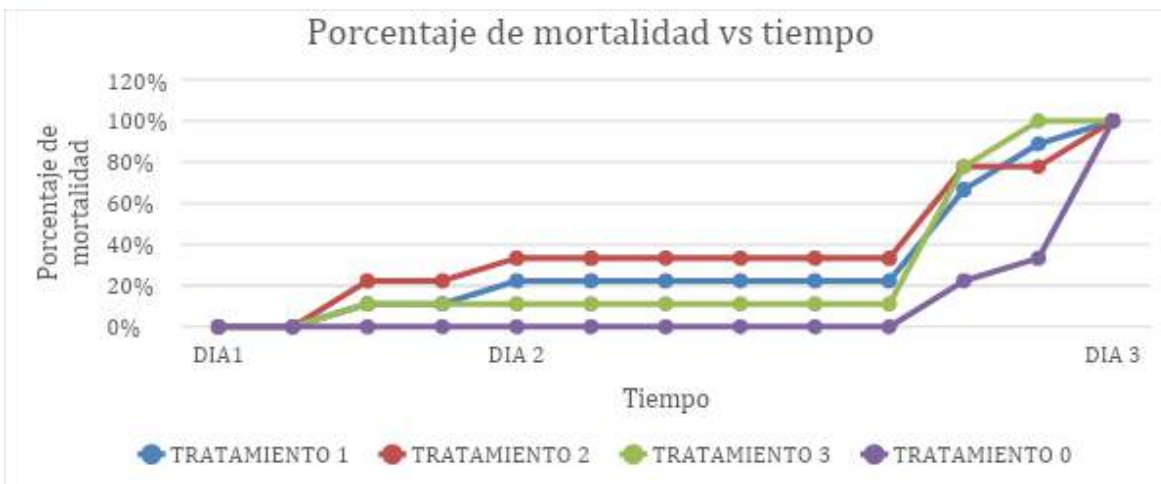
Fd: 10^{-17}

14 colonias x 50000 x 100000000000000000

- *Trichoderma*= $7,0 \times 10^{22}$ conidios/mL

7.5. Prueba de patogenicidad *in vitro*.

Los resultados de mortalidad respecto al tiempo presentaron diferencias significativas en la prueba ANOVA (Ver Anexo F) por tanto, se hicieron pruebas de comparaciones de media Duncan y Tukey, en las comparaciones múltiples realizadas con Tukey se observa que el día 3 presento diferencias de medias con el día 1 de -94,5 y con el 2 de -70,59, esto debido a que en la última revisión del día 3 el 100% de los insectos estaban muertos (Ver Anexo F). La media del porcentaje de mortalidad del día 2 fue de 29,41%, este día en la revisión 12 los tratamientos presentaron su mayor porcentaje de mortalidad T1=89%, T2=78%, T3=100% y el Control un 33%, al contrastar estos resultados se puede decir que los bioformulados de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma sp.* (T3) aplicados en conjunto presentaron el mejor resultado en esta prueba *in vitro*, por lo que es posible la aplicabilidad de este tratamiento en el control biológico del insecto adulto *Diaphorina citri*.



Gráfica 5. Porcentaje de mortalidad vs tiempo.

En un ensayo realizado por Gomez, (2022) en donde utilizo 2 cepas del género *Trichoderma sp.*, 1 cepa de *Cladosporium sp.*, 1 cepa de *Beauveria sp.* y 1 cepa de *Metarhizium sp.*, obtuvo que tres de estos: *Beauveria sp.*, *Metarhizium sp.*, y *Trichoderma sp.*, presentaron patogenicidad para adultos de *D. citri* en condiciones de laboratorio sobre plántulas de *M. paniculata*, alcanzando mortalidades entre el 68% a 94 %. Vallejo *et al.*, (2014) resaltan la capacidad insecticida y quitinolítica de *Trichoderma spp.* al obtener en su investigación una significativa colonización en el insecto *Drosophila melanogaster*. Por otra parte, *B. bassiana* libera metabolitos tóxicos, como la beauveriacina (BEA) que tiene propiedades antibacterianas e insecticidas esto provoca una degeneración progresiva de los tejidos del huésped (Moreno, 2021). El nivel de patogenicidad de los hongos entomopatógenos puede variar según su origen, nicho ecológico, condiciones físicas y metabólicas y otros factores (Gómez, 2022).

% MORTALIDAD					
Dia 1	11	a	T0	44,3	a
Dia 2	75	b	T1	66,7	a
Dia 3	100	b	T2	66,7	a

	T3	70,3	a
*a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000	*a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media.		
Duncan *a	Duncan *a		

Tabla 5. Prueba de Duncan del porcentaje de mortalidad. $F=0.05$

7.6. Potencial de *Trichoderma sp.* en la disminución del Nivel de Daño Económico (NDE) frente a la enfermedad del Huanglongbing en plantas de *Citrus limon*.

Inicialmente las plantas de limón 7 y 8 presentaron porcentajes de severidad de 53,7 y 54% respectivamente y Nivel de daño Clase 2, al ser tratadas con un biopreparado de *Trichoderma spp.* a una concentración de $7,0 \times 10^{22}$ conidios/mL 1 vez por 4 semanas, se evidenció una mejoría frente a los daños que ocasiona esta fitopatología y su agente causal *Candidatus Liberibacter* dando como resultado para el Árbol 7 un porcentaje de severidad de 30,4% con una reducción de 23,3% con respecto a la severidad inicial y 41,2% para el Árbol 8 con una diferencia de 12,8%, clasificándolos en un Nivel de daño tipo 1.

También, alcanzaron el desarrollo de frutos, cabe resaltar que este estadio fenológico no había sido evidenciado en las plantas anteriormente, según la información suministrada por el jardinero del Parque, quien realizó la siembra de los árboles en estudio. De todos los árboles tratados en estos hubo mayor desarrollo de frutos (Ver Figura 5), específicamente el Árbol 8 de donde se tomó 2 muestras A y B, calculando variables morfológicas tales como Peso, Diámetro polar, Diámetro ecuatorial, Grosor de la cáscara y Volumen del jugo (Ver Tabla 6).

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS MUESTRAS DE FRUTOS TOMADAS DEL ARBOL 8					
LIMON	PESO. (gr)	DIAMETRO ECUATORIAL. (mm)	DIAMETRO POLAR. (mm)	GROSOR DE LA CASCARA. (mm)	VOLUMEN DE JUGO. (ml)
A	31	5	11,5	2	10
B	28	5	11	2	10

Tabla 6. Resultados de las variables morfológicas tomadas de las muestras de limones A y B

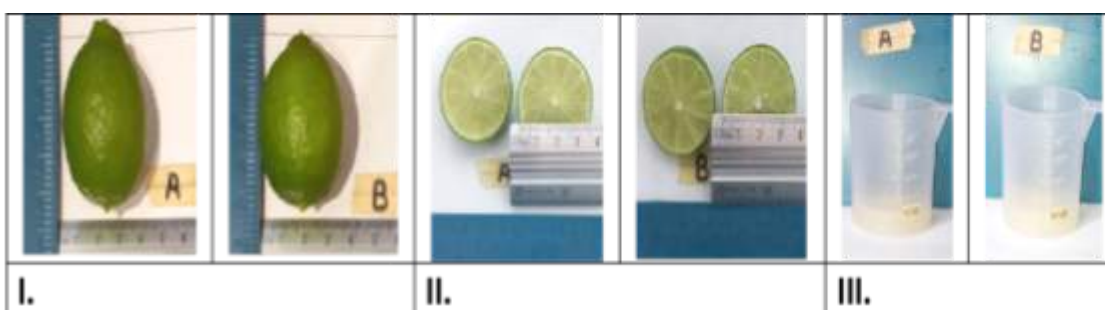


Figura 6. Dos muestras de limones tomadas del Árbol 8. I) Limones A y B enteros. II) Limones A y B partidos a la mitad por el eje ecuatorial. III) Jugo extraído de los limones A y B.

Estos resultados se pueden atribuir a la capacidad de *Trichoderma sp.* de inducir resistencia sistémica en el hospedero, el cual involucra cambios celulares, tales como un aumento de depósitos de calosa en el interior de la pared celular y



Figura 5. Arboles 7 y 8 postratamiento con desarrollo de limones.

aumento en la actividad peroxidasa y quitinasa, además, de su capacidad antagónica y reguladora de microorganismos patógenos (López *et al.* 2017). Por lo anterior, es posible decir que *Trichoderma sp.* se puede presentar como agente de control biológico para la inhibición de patógenos en plantas, logrando el mejoramiento en el rendimiento vegetal.

Así mismo, lo menciona Sánchez y Bustos (2019) donde 5 cepas de *Trichoderma sp.* mostraron un buen potencial antagónico contra fitopatógenos foliares con un porcentaje de inhibición mayor al 60 % en pruebas de laboratorio demostrando que pueden ser considerados efectivos en campo. En otro ensayo *Trichoderma sp.* frente a *B. cinerea* patógeno de la mora alcanzó un porcentaje de inhibición del 73,7% (Pincay *et al.* 2020). Este agente biológico obtuvo resultados favorables en plantas de jitomates, mostrando incrementos significativos en la mayoría de las variables de respuesta evaluadas, donde *T. longibrachiatum* promovió significativamente el crecimiento de la planta (altura $\geq 13\%$) y el rendimiento (14%), mostrando potencial para mejorar la calidad del fruto (Ruiz *et al.*, 2018).

El potencial de este hongo también está dado por su capacidad de promover el crecimiento vegetal formando asociaciones con la rizósfera o de manera endofítica con las plantas, mediante la producción de auxinas y giberelinas; también pueden producir ácidos orgánicos (glucónico, fumárico, y cítrico) que pueden disminuir el pH del suelo y propiciar la solubilización de fosfatos, magnesio, hierro y manganeso como lo menciona Hernandez *et al.*, (2019). Teniendo en cuenta la disminución en el porcentaje de severidad, nivel de daño y desarrollo de frutos en las plantas evaluadas es posible proponer al hongo *Trichoderma* como una posibilidad para contrarrestar los daños ocasionados por el Huanglongbing en *Citrus limon*.

8. CONCLUSION

En cuanto a la medición del Nivel de daño del HLB y el nivel de infestación de *D. citri* en los Árboles muestreados es pertinente decir que el uso de herramientas tecnológicas fue de gran ayuda en la recolección y procesamiento de los datos obtenidos, es decir, dichas herramientas facilitaron y agilizaron la obtención de los resultados. Así mismo, se concluye que las plantas de limón que recibieron tratamiento a base de *Trichoderma sp.* mostraron una mejoría en cuanto al Nivel de daño y alcanzaron la producción de frutos, por lo que se puede tener en cuenta el potencial de dicho hongo como agente biocontrolador y una opción para la

recuperación de los síntomas que causa el Huanglongbing en las plantas de limón.

Por otra parte, el control del insecto adulto *Diaphorina citri* mediante el uso del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* no alcanzó la reducción esperada en el nivel de infestación en campo. Los hongos *Trichoderma sp* y *B. bassiana* aplicados en conjunto mostraron ser eficientes y viables para el manejo de la enfermedad Huanglongbing en este estudio. Es posible decir que los tratamientos biológicos aplicados resultan eficientes en la disminución de la severidad de la enfermedad Huanglongbing, y aportan sostenibilidad para el medio ambiente.

Por otra parte, el control químico brinda una mejor efectividad para el manejo de la plaga, aunque, no se debe descartar la posibilidad de ensayar con hongos entomopatógenos diferentes a los usados en esta práctica o concentraciones más elevadas de biopreparados de *Beauveria bassiana*. También, se concluye que cuando el daño de la enfermedad alcanza un nivel tipo 2, es preciso prolongar el tiempo del tratamiento biológico a más de 4 aplicaciones pudiendo conseguir la recuperación de los árboles y una disminución en el nivel de infestación. Por lo tanto, se logró el cumplimiento al desarrollo del objetivo general el cual fue evaluar la eficiencia de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Trichoderma sp.* en plantas de limón en la ciudad de Valledupar.

9. RECOMENDACIONES

- Implementar programas de manejo integrado de plagas, donde se evite el uso indiscriminado de insecticidas químicos durante el periodo de crecimiento vegetativo, se favorezcan aquellos productos más inocuos con el medio ambiente y el complejo de enemigos naturales
- Continuar llevando a cabo este tipo de investigaciones donde se estudien productos de origen biológico, los cuales son implementados dentro de la

agricultura orgánica, fomentando e impulsando la producción de alimentos de calidad sin presencia de residuos químicos.

- Desarrollar investigaciones en otros cultivos de interés económico regional, para determinar así, el impacto que tiene en ellos el uso de *Trichoderma sp.* y *Beauveria bassiana* como promotores de crecimiento y el control biológico.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRFICAS

Alvarenga Navarrete , L. A., Campos Cabrera, L. J., González Guadrón, J. T., Menjívar Rosa, R. A., & Cuadra Campos, E. J. (2020). Estudio de la dinámica poblacional del psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*: Hemíptera: Psyllidae) en el cultivo de Limón Pésico (*Citrus latifolia* Tanaka) en tres fincas comerciales del municipio de San Juan Opico, La Libertad, El Salvador.

Agrociencia(17), 47-55. Recuperado el 2023, de
<https://www.agronomia.ues.edu.sv/agrociencia/index.php/agrociencia/article/view/128/141>

- Arora, A., Kaur, P., Kumar, M., & Saini, V. (2017). Production of Biopesticides Namely *Trichoderma viride* and *Beauveria bassian*. *Indian Journal of Science and Technology*, 10(26), 2-7. doi:10.17485/ijst/2017/v10i26/110796
- Baron, N., Rigobelo, E., & Zied, D. (2019). Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. *Chilean journal of agricultural research*, 79(2), 307-315. doi:10.4067/S0718-58392019000200307
- Berger, J., Preussler, C., & Agostini, J. (2018). Identificación de síntomas de Huanglongbing en hojas de cítricos mediante técnicas de deep learning. *CAI, Congreso Argentino de AgroInformática*, 90-103. Recuperado el 29 de Marzo de 2020, de <http://rcfb.uanl.mx/index.php/rcfb/article/view/199>
- Berlanga-Padilla, A., Gallou, A., Ayala-Zermeño, M., Serna-Domínguez, M., Montesinos-Matías, R., Rodríguez-Rodríguez, J., & Arredondo-Bernal, H. (2018). Hongos entomopatógenos asociados a *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en Colima, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89, 986-1001. Recuperado el 10 de Marzo de 2020, de https://www.researchgate.net/publication/329157963_Hongos_entomopatogenos_asociados_a_Diaphorina_citri_Hemiptera_Liviidae_en_Colima_Mexico
- Candela Ferre, J. (2020). Situación actual y perspectivas de control del Huanglongbing de los cítricos. Repositorio Institucional URV. Obtenido de <https://repositori.urv.cat/fourrepopublic/search/item/TFG%3A3024>
- Chiriboga P., H., Graciela , G., & Karla, G. (2015). *Beauveria bassiana*, hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras. IICA. Recuperado el 29 de Marzo de 2020, de <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2646/BVE17038724e.pdf;jsessionid=9761F0C3872C6F4E47CBE01705D832B8?sequence=1>

- Cochrane, E., & Shade, J. (2019). Combatting Huanglongbing in Organic Systems. *International journal of Horticulture, Agriculture and Food science*, 3, 1-11. doi:<https://dx.doi.org/10.22161/ijhaf.3.1.1>
- Cruz Cruz, D. (2016). *Patogenicidad de Beauveria bassiana sobre estados inmaduros de Diaphorina citri (Hemiptera: Liviidae), bajo condiciones de laboratorio y jaula de campo*. *Ecosur*. Recuperado el 10 de Abril de 2020, de <http://bibliotecasibe.ecosur.mx/sibe/book/000057629>
- Cruz, D. (2016). *Patogenicidad de Beauveria bassiana sobre estados inmaduros de Diaphorina citri (Hemiptera: Liviidae), bajo condiciones de laboratorio y jaula de campo*. Recuperado el 29 de Marzo de 2020, de <http://bibliotecasibe.ecosur.mx/sibe/book/000057629>
- Cuervo-Mulet, R. A., López-Villalobos, I. D., Trujillo-Perdomo, J. F., Fernández-Daza, F. F., & Vélez-Correa, S. L. (2018). Riscos de saúde do trabalho associados ao uso de bioinsecticida com esporos de Beauveria bassiana e Trichoderma lignorum. *Entramado*, 14(2), 244-255.
- Cuervo-Mulet, R. A., López-Villalobos, I. D., Trujillo-Perdomo, J. F., Fernández-Daza, F. F., & Vélez-Correa, S. L. (2018). Riscos de saúde do trabalho associados ao uso de bioinsecticida com esporos de Beauveria bassiana e Trichoderma lignorum. *Entramado*, 14(2), 244-255.
- Devia, E. H. V., Berdugo, Á. M. V., Polanco, E. R., Artilles, L. P., Molina, J. H. G., Rodríguez, D. T. K., ... & Sierra, E. M. R. (2020). Métodos de detección de HLB y de monitoreo y control biológico del vector Diaphorina citri en cultivos de cítricos en el Tolima.
- Díaz-Padilla, G., López-Arroyo, J. I., Sánchez-Cohen, I., Rafael Alberto, G.-P., Mora-Aguilera, G., & Quijano-Carranza, J. (2014). Áreas de abundancia potencial en México del vector del Huanglongbing, Diaphorina citri (Hemiptera: Liviidae). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(7), 1137-1153. Recuperado el 10 de Marzo de 2020
- Erráez Aguilera, M., Mazón, M., Troya Armijos, H., & Valarezo Espinoza, D. (2020). Identificación y evaluación de la incidencia de insectos y hongos benéficos asociados a Diaphorina citri kuwayama (hemiptera: liviidae) en

- plantas traspatio (Citrus spp. y *Murraya paniculata*) del cantón Catamayo (Loja - Ecuador). *Revista Científica Ecuatoriana*, 7(1), 25 - 33. doi:doi.org/10.36331/revista.v7i1.99
- Espinoza Ruiz, G., & Vallejos Treminio, F. (2016). *Desarrollo de formulaciones bioplaguicidas a base de Beauveria bassiana (Bals & Vuils) con materiales sólidos y líquidos*. Recuperado el 4 de Mayo de 2020, de <https://repositorio.una.edu.ni/3387/1/tnh10e77.pdf>
- Flores Sánchez, J., Mora aguilera, G., Loeza Kuk, E., López Arroyo, J., Dominguez Monge, S., Acevedo Sánchez, G & Robles García, P. (2015). Pérdidas en producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195 – 210. Recuperado el 25 de Agosto de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000200195&lng=es&tlng=es.
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G y Robles-García P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195-210.
- Gandarilla-Pacheco, F., López-Arroyo, J., Galán-Wong, L., & Quintero-Zapata, I. (2013). Patogenicidad de Hongos Entomopatógenos Nativos de la Zona Citrícola de México sobre Ninfas de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *SOUTHWESTERN ENTOMOLOGIST*, 38(2), 325-338. Recuperado el 10 de Marzo de 2020, de https://www.researchgate.net/publication/273690522_Patogenicity_of_Native_Entomopathogenic_Fungi_from_the_Mexican_Citrus-Growing_Area_against_Diaphorina_citri_Kuwayama_Hemiptera_Liviidae
- Garza-Saldaña, J., Varela-Fuentes, S., & Gómez-Flores, W. (2017). Métodos para la detección presuntiva de Huanglongbing (HLB) en cítricos. *BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS*, 2, 93-104. Recuperado el 10 de Marzo de 2020, de

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582017000100093

Gómez, A. (2018). Análisis de experiencias en el mundo sobre la investigación y el manejo del Huanglongbing (HLB) de los cítricos y la aplicación en Colombia [Trabajo de grado para optar el título especialización en Biotecnología agraria]. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/21397>

Gomez-Hurtado, K. D. (2022). Evaluación de la Susceptibilidad de Diaphorina citri Kuwayama Insecto Vector del HLB Frente a Cepas Fúngicas con Potencial Entomopatógeno en Condiciones in vitro.

Gomez-Hurtado, K. D. (2022). Evaluación de la Susceptibilidad de Diaphorina citri Kuwayama Insecto Vector del HLB Frente a Cepas Fúngicas con Potencial Entomopatógeno en Condiciones in vitro.

Hussain, M., Senyo, K., Lin, Y., Chen, S., Huang, W., Zhang, J., Idrees, A., Qiu, D., Wang, L. (2018). Susceptibilities of Candidatus Liberibacter asiaticus-infected and noninfected Diaphorina citri to entomopathogenic fungi and their detoxification enzyme activities under different temperatures. *MicrobiologyOpen*, 7, 1-9. <https://doi.org/10.1002/mbo3.607>.

Lomas , C., Loeza, E., Munguía, R., & Ferral, J. (2021). Ventanas climáticas ADHOC en la aplicación de hongos entomopatógenos en campo para el control de Diaphorina citri Kuwayana (Hemiptera: Liviidae). *Sociedad Mexicana de control biológico, A.C.*, 39-45.

López-Ferrer, U., Brito-Vega, H., López-Morales, D., Salaya-Domínguez, J., & Gómez-Méndez, E. (2017). PAPEL DE Trichoderma EN LOS SISTEMAS AGROFORESTALES-CACAOTAL. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20, 91-100. Recuperado el 29 de Marzo de 2020, de <https://www.redalyc.org/pdf/939/93950595003.pdf>

Luis Pantoja, M., Hernández Rodríguez, L., Collazo Cordero, C., Peña, I., Zamora Rodríguez, V., López Hernández, D., . . . Batista, L. (2014). Diagnóstico y caracterización de la enfermedad huanglongbing de los cítricos para el establecimiento de su manejo en Cuba. *Instituto de*

Investigaciones en Fruticultura Tropical, 9-47. Recuperado el 10 de Marzo de 2020, de https://www.researchgate.net/publication/274719351_Diagnostico_y_caracterizacion_de_la_enfermedad_huanglongbing_de_los_citricos_para_el_establecimiento_de_su_manejo_en_Cub

Luis Pantoja, M., Hernández Rodríguez, L., Collazo Cordero, C., Peña, I., Zamora Rodríguez, V., López Hernández, D., . . . Batista, L. (2014). Diagnóstico y caracterización de la enfermedad huanglongbing de los cítricos para el establecimiento de su manejo en Cuba. *Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical*, 9-47. Recuperado el 10 de Marzo de 2020, de https://www.researchgate.net/publication/274719351_Diagnostico_y_caracterizacion_de_la_enfermedad_huanglongbing_de_los_citricos_para_el_establecimiento_de_su_manejo_en_Cub

Malpartida-Zevallos, J., Narrea-Cango, M., & Dale-Larraburre, W. (2013). PATOGENICIDAD DE *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., SOBRE EL GUSANO DEFOLIADOR DEL MARACUYÁ *Dione juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) EN LABORATORIO. *Ecología Aplicada*, 12(2), 76-81. Recuperado el 10 de Marzo de 2020, de <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v12n2/a02v12n2>

Mascarin GM, Jaronski ST. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World J Microbiol Biotechnol.* 32(11):177. eng. doi:10.1007/s11274-016-2131-3.

Mascarin GM, Jaronski ST. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World J Microbiol Biotechnol.* 32(11):177. eng. doi:10.1007/s11274-016-2131-3.

Ministerio de Agricultura y desarrollo rural. (27 de Febrero de 2004). *Instituto Colombiano Agropecuario*. Recuperado el 20 de Abril de 2020, de <https://www.ica.gov.co/normatividad/normas-ica/resoluciones-oficinas-nacionales/resoluciones-derogadas/resolucion-375-de-2004.aspx>

- Moncayo-Donoso, M., Almanza-Pinzón, M., Caicedo-Vallejo, A. M., Muñoz-Flórez, J. E., Montoya-Lerma, J., & Carabalí-Muñoz, A. (2014). Diversidad genética de *Diaphorina citri* en cultivos cítricos del valle del cauca y Quindío (Colombia). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12, 106-114. Recuperado el 10 de Marzo de 2020, de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v12n2/v12n2a12.pdf>
- Monzó, C., Urbaneja, A., & Tena, A. (2015). *Los psílicos Diaphorina citri y Trioza erytreae como vectores de la enfermedad de cítricos Huanglongbing (HLB): reciente detección de T. erytreae en la Península Ibérica*. Recuperado el 29 de Mrzo de 2020, de <https://core.ac.uk/download/pdf/52476094.pdf>
- Mora-Aguilera, G., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G., Domínguez-Monge, S., Oropeza-Salin, C., Flores-Olivas, A., . . . Robles-García, P. (2014). Vigilancia Epidemiológica y Estatus Actual del Amarillamiento Letal del Cocotero, Punta Morada de la Papa y Huanglongbing de los Cítricos (HLB) en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(2), 120-131. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092014000200120

Moreno, D. H. (2021). Comparación de dos métodos de producción de Beauveria bassiana y su uso en campo como insecticida microbiano: Revisión de Literatura.

- Moreno, D. H. (2021). Comparación de dos métodos de producción de Beauveria bassiana y su uso en campo como insecticida microbiano: Revisión de Literatura.
- Nicholls Estrada, C. (2008). *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Palomares-Pérez, m., Córdoba-Urtiz, e., Sánchez-González, j., Medina-García, n., Hernández-Mendoza, r., Pérez-Díaz, v., & Arredondo-Bernal, H. (2015). Aspectos biológicos de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) bajo condiciones no controladas en invernadero. *2R2e8vista Colombiana de Entomología*, 41, 228-234. Recuperado el 10 de Marzo de 2020, de

http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-04882015000200013&script=sci_abstract&tIng=es

- Pérez Casar, L. (2018). Control biológico, una estrategia tan sostenible como rentable. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 44(2), 4-8. Recuperado el 29 de Marzo de 2020, de <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/ria/issue/view/749>
- Ramos, Y. (2016). *Identificación de hongos entomopatógenos de Diaphorina citri Kuwayama, en los departamentos del Valle del Cauca y Quindío, Colombia*. Recuperado el 29 de Marzo de 2020, de http://bdigital.unal.edu.co/53469/1/Yenmy_Josue_Ramos_Delgado.pdf
- Rodríguez Villarreal, R., Rodríguez Guerra, R., López Arroyo, J., & Almeyda León, I. (2018). Hongos entomopatógenos de suelo de huertas cítricas en Nuevo León. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicas*, 52. Recuperado el 29 de MARzo de 2020, de <http://rcfb.uanl.mx/index.php/rcfb/article/view/199>
- Santivañez C., T., Díaz Padilla, G., López Arrollo, J., & Vernal Hurtado, P. (2013). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)*. Recuperado el 10 de Marzo de 2020, de <http://www.fao.org/3/a-i3319s.pdf>
- Santivañez, T., Mora Aguilera, G., Díaz Padilla, G., Lopez Arrollo, J. I., & Vernal Hurtado, P. (2013). Citrus: Marco estratégico para la gestión regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe.
- Soto Pertuz, A. C. (2020). Revisión general acerca del HLB (Huanglongbing) o enfermedad del enverdecimiento de los cítricos.
- Ullah, M. I., Arshad, M., Abdullah, A., Khalid, S., Iftikhar, Y., & Ali Zahid, S. M. (2018). Use of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) and *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) to control *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) under laboratory and semi-field conditions. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28-75. doi:<https://doi.org/10.1186/s41938-018-0071-y>

- Valdés Ríos, E. (2014). Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que aporta el uso de Trichoderma como control biológico. *Agroecosistemas*, 2, 254-264. Recuperado el 10 de Marzo de 2020, de <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes>
- Vallejos Sirpa, J. G., Espinal, C., Mollinedo, P., & Terrazas Siles, E. (2014). Evaluación de actividad insecticida y quitinolítica de Trichoderma inhamatum y Beauveria bassiana en la mosca de la fruta Drosophila melanogaster. *Revista Boliviana de Química*, 31(1), 5-9. Recuperado el 10 de Marzo de 2020, de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602014000100002
- Varón Devia, E.H. (2020). Métodos de detección de HLB y de monitoreo y control biológico del vector Diaphorina citri en cultivos de cítricos en el Tolima. Agrosavia, YUMA. https://www.agrosavia.co/media/hdvisbg3/ver_documento_36478.pdf
- Zapata, Y., Osorio, E., Silva, J., Delgado, R., Rodriguez, R., Alvarez, R. (2022). Situación actual, impacto económico y control del Huanglongbing en Tamaulipas. *Revista Multidisciplinar Ciencia Latina*, 6(1). https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i4.683 p 4242.

1. ANEXOS

ANEXO A: Arboles pre y postratamiento

ARBOLES PRETRATAMIENTO	ARBOLES POSTRATAMIENTO
------------------------	------------------------



ARBOL 1



ARBOL 1



ARBOL 2



ARBOL 2



ARBOL 3



ARBOL 3



ARBOL 4



ARBOL 4



ARBOL 5



ARBOL 5



ARBOL 6



ARBOL 6



ARBOL 7



ARBOL 7



ARBOL 8



ARBOL 8



ARBOL 9



ARBOL 9



ARBOL 10



ARBOL 10



ARBOL 11



ARBOL 11

ANEXO B. PREPARACIÓN SOLUCIÓN MADRE



ANEXO C: TRAMPAS DE ARROZ INOCULADAS



ANEXO D: ASPERSION DE LOS BIOINSUMOS



ANEXO E: HOJA SINTOMÁTICA CONTRASTADA CON IMAGEJ Y SIN CONTRASTAR.



ANEXO F: PRUEBAS ESTADÍSTICAS

ANOVA

%SEVERIDAD

PRETRATAMIENTO	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	488467852,5	10	48846785,258	1,360	,230
	82				

Dentro de grupos	1580617906, 800	44	35923134,245		
Total	2069085759, 382	54			

ANOVA

%SEVERIDAD

POSTRATAMIENTO	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4542742409,636	10	454274240,964	9,905	<,001
Dentro de grupos	2017967726,800	44	45862902,882		
Total	6560710136,436	54			

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Nivel infestacion pretratamiento	Entre grupos	5507,545	10	550,755	32,111	<,001
	Dentro de grupos	566,000	33	17,152		
	Total	6073,545	43			
Nivel infestacion postratamiento	Entre grupos	311,182	10	31,118	3,846	<,002
	Dentro de grupos	267,000	33	8,091		
	Total	578,182	43			

ANOVA

EFFECTIVIDAD X DIA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	16856,000	2	8428,000	26,746	<,001

Dentro de grupos	2836,000	9	315,111		
Total	19692,000	11			

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: EFE

	(I) DIA	(J) DIA	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD	1	2	-64,000*	12,552	,002	-99,05	-28,95
Tukey		3	-89,000*	12,552	<,001	-124,05	-53,95
	2	1	64,000*	12,552	,002	28,95	99,05
		3	-25,000	12,552	,170	-60,05	10,05
	3	1	89,000*	12,552	<,001	53,95	124,05
		2	25,000	12,552	,170	-10,05	60,05

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANOVA

EFFECTIVIDAD POR TTO

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1275,333	3	425,111	,185	,904
Dentro de grupos	18416,667	8	2302,083		
Total	19692,000	11			