

Evaluation of the effectiveness of an entomopathogenic consortium for the control of mealybug (*Planococcus citri*) located on the María Auxiliadora campus of the Salesian Polytechnic University

Evaluación de la eficacia de un consorcio entomopatógeno para el control de cochinilla harinosa (*Planococcus citri*) ubicada en el campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana

Solange del Rocío Lituma Carriel¹  

¹Universidad Estatal de Milagro. Ecuador.

Cite as

Lituma Carriel S del R. Evaluation of the effectiveness of an entomopathogenic consortium for the control of mealybug (*Planococcus citri*) located on the María Auxiliadora campus of the Salesian Polytechnic University. SAP Biomedical & Chemical Engineering Innovation. 2024; 3:123. <https://doi.org/10.56294/evk2024123>

Publication History

Submitted: 16-06-2023

Revised: 12-10-2023

Accepted: 10-01-2024

Published: 11-01-2024

Corresponding Author

Solange del Rocío Lituma Carriel 

ABSTRACT

Introduction: in the city of Guayaquil, the mealybug pest poses a threat to various plant species. Biological control strategies, such as the use of one of its natural predators, ladybugs, are also possible, as are other solutions such as the use of entomopathogenic fungi.

Objective: to evaluate the efficacy of an entomopathogenic consortium consisting of the species *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii*, and *Purpureocillium lilacinum* against the mealybug species *Planococcus citri* in lemon plants.

Method: the experimental strategy was carried out on the grounds of the Salesian Polytechnic University, María Auxiliadora campus. Lemon trees were infected with *Planococcus citri* for 4 to 6 months, two weeks before the application of the treatments. The 7 treatments, except for the application control, consisted of 3 different concentrations (200 %, 100 %, and 50 %) of the positive control (chemical detergent) and the entomopathogenic consortium.

Results: the mortality rate of scale insects and the efficacy of the consortium were analyzed. Treatment 3 (100 %) produced the highest mortality rate; while treatment 2, the positive control, and treatment 3, the entomopathogenic consortium, showed no significant differences in efficacy. In addition, chlorophyll was analyzed before and after treatment; treatment 3 showed significant differences compared to the positive control treatments.

Conclusions: the entomopathogenic fungal consortium proved to be an effective alternative to chemical insecticides for controlling *Planococcus citri*, as higher mortality of the pest and a significant population reduction were observed with the use of this treatment compared to the negative and positive controls.

Keywords: Entomopathogenic Consortium; *Planococcus Citri*; Biological Control; Invertebrates; Bioinsecticide.

RESUMEN

Introducción: en la ciudad de Guayaquil, la plaga de la cochinilla supone una amenaza para diferentes especies de plantas. Estrategias de tipo control biológico como el uso de uno de sus depredadores naturales, las mariquitas, es posible utilizar otras soluciones como el uso de hongos entomopatógenos.

Objetivo: evaluar la eficacia de un consorcio entomopatógeno conformado por las especies *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* y *Purpureocillium lilacinum* contra la especie de cochinillas *Planococcus citri* en plantas de limón.

Método: la estrategia experimental fue llevada a cabo en los predios de la Universidad Politécnica Salesiana, campus María Auxiliadora. Se infectaron *Planococcus citri* en los limoneros de entre 4 a 6 meses, dos semanas antes de la aplicación de los tratamientos. Los 7 tratamientos, excepto el control de aplicación, consistieron en 3 diferentes concentraciones (200 %, 100 % y 50 %) del control positivo (detergente químico) y el consorcio entomopatógeno.

Resultados: se analizó el índice de mortalidad de cochinillas y la eficacia del consorcio. El tratamiento 3 (100 %) produjo la mayor tasa de mortalidad; mientras que el tratamiento 2, del control positivo, y el tratamiento 3, del consorcio entomopatógeno, no mostraron diferencias significativas en cuanto eficacia. Además, se analizó clorofila antes y después del tratamiento, el tratamiento 3 mostró diferencias significativas contra los tratamientos del control positivo.

Conclusiones: el consorcio de hongos entomopatógeno demostró ser una alternativa eficaz al insecticida químico para

el control de *Planococcus citri*, debido a que se observó una mayor mortalidad de la plaga y una reducción significativa de la población con el uso del tratamiento frente al control negativo y el control positivo.

Palabras clave: Consorcio Entomopatógeno; *Planococcus Citri*; Control Biológico; Invertebrados; Bioinsecticida.

INTRODUCCIÓN

La cochinilla de los cítricos, *Planococcus citri*, es un insecto chupador de savia reconocido mundialmente que proviene de Asia, pero, se ha extendido en todo el mundo.⁽¹⁾ Se alimenta de una gran variedad de plantas ornamentales, frutales hasta de cítricos, de donde proviene su nombre.⁽²⁾ Este parásito excreta una sustancia pegajosa llamada melaza que promueve la aparición de otros organismos que se alimentan de esta como las hormigas.^(1,3,4)

En Guayaquil, Ecuador en el año 2020 aparecieron los primeros brotes de la plaga reportados por el Municipio de la ciudad, generando una problemática de relevancia por estos últimos años. La cochinilla se ha propagado de forma beligerante extendiéndose a una gran variedad de plantas de la ciudad.⁽⁵⁾ Estos insectos están presentes en parques, hogares, bosques, centros educativos; afectando todas las áreas verdes de distintas zonas de la ciudad. Una de las zonas afectadas es el campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana donde más del 50 % de su extensión está cubierta por áreas verdes, los daños causados tienen un impacto negativo en el crecimiento foliar de las especies vegetales afectando también en su desarrollo.

Los hongos entomopatógenos (HEPs) infectan a la gran mayoría de artrópodos, incluido los insectos. Son rivales naturales capaces de terminar con poblaciones enteras de ciertas especies pertenecientes a ese Filum.^(6,7) Por ello, son una estrategia integral para el control sostenible de estos organismos.⁽⁸⁾ A causa de su capacidad patogénica son usados como medida de biocontrol de plagas. Las aplicaciones de estos HEPs se pueden efectuar en combinación con otras especies fúngicas, lo cual es conocido como consorcio.

Entre los consorcios más renombrados tenemos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecani* y *Purpureocillium lilacinum* los cuales pueden trabajar en sinergia para crecer y reproducirse como patógenos oportunistas.

Los insectos se vuelven susceptibles a estos patógenos por la infección que provocan mediante esporas, el huésped se aferra a la superficie exterior del cuerpo del organismo y comienza a germinar descomponiendo al insecto desde adentro causándole la muerte.⁽⁹⁾ Del cuerpo sin vida del huésped emergen las hifas y pueden permanecer en los tejidos superiores del artrópodo, donde vuelven a esporular cuando las condiciones ambientales son adecuadas.⁽¹⁰⁾

Debido a los mecanismos de acción de los HEPs surgen como una alternativa sostenible para el control de insectos poseyendo ventaja sobre los insecticidas químicos puesto que estos artrópodos han demostrado una creciente resistencia a los mismos.^(2,11,12) El objetivo de este estudio fue determinar la eficacia de un consorcio de HEPs en cochinillas harinosas (*Planococcus citri*) ubicadas en la Universidad Politécnica Salesiana campus “María Auxiliadora”.

Justificación

Las plantas son de fundamental importancia debido a que ayudan a mejorar la calidad del aire produciendo oxígeno y mitigando el cambio climático al ser sumideros de carbono, de igual manera los árboles son de vital importancia ya que permiten la estabilidad del suelo evitando deslizamientos. Estas razones figuran como las principales para la conservación de estos organismos.

El municipio al ser el encargado del mantenimiento y conservación de las áreas verdes de la ciudad de Guayaquil ha buscado soluciones para combatir la plaga de cochinilla en estos espacios públicos. Ha implementado una serie de medidas como la liberación de mariquitas y otros depredadores naturales de estos insectos, también, cortar el follaje como medida para disminuir la plaga. Las medidas antes descritas han tenido cierto éxito, pero la plaga de cochinillas se mantiene, por lo tanto, es necesario probar otras acciones para combatir esta infestación en espacios privados como es el caso del campus María Auxiliadora.

El campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana está cubierto por áreas verdes y un gran porcentaje de esas áreas están infectadas por cochinillas, entre las especies identificadas por las autoras de este trabajo se encuentran *Planococcus citri*, *Orthezia sp.* la cual es abundante en los árboles cítricos de la universidad y *Pseudococcus longispinus*.

Los daños causados por las Pseudococcidae tienen un impacto negativo en el follaje de las plantas debido a que estos insectos succionan la savia y no solo generan debilitamiento, sino que lo maximizan llevando a las plantas a la muerte. Debido a que la savia tiene en disolución todos los elementos que necesitan las plantas para crecer, reproducirse y sobrevivir.^(13,14,15) Por su alimentación excretan melaza, atraen a hormigas lo que tiende a agravar el problema puesto que ellas se encargan de movilizar a las cochinillas causando una mayor proliferación de la plaga.

Aunque el presente trabajo se centra en *Planococcus citri* existe una gran variedad de especies de Pseudococcidae que también están afectando a la ciudad y al campus María Auxiliadora, pero la especie de la que trata este estudio tiene más relevancia debido a que tiene una mayor resistencia a los insecticidas, por ello, son organismos perfectos para realizar la prueba de eficacia de pesticidas.⁽¹⁶⁾

La *Planococcus citri* al mostrar mayor resistencia a los insecticidas y ser usada en Corea para evaluar la eficacia de insecticidas.⁽¹⁶⁾ Será una alternativa sobre las demás especies de cochinillas que afectan al campus María Auxiliadora de la Universidad Politécnica Salesiana y a la ciudad de Guayaquil.

La aplicabilidad de los HEPs para el control de la cochinilla en el campus María Auxiliadora es una alternativa prometedora.

Debido a que reduce el uso de insecticidas químicos, los cuales pueden tener efectos negativos en el medio ambiente y la salud humana. Además, los insecticidas químicos suelen generar resistencia, por otra parte, los biocontroladores como los HEPs tienen un mejor impacto debido a sus mecanismos de acción, donde los insectos se vuelven susceptibles a la infección cuando las esporas se aferran a la superficie exterior de su cuerpo. Una vez que estas esporas detectan señales en la cutícula, el patógeno comienza a germinar. Durante este proceso se segregan una variedad de enzimas que tienen como objetivo descomponer la cutícula del insecto. La acción conjunta de estas enzimas y la presión mecánica generada por los tubos germinales resulta en la ruptura de la cutícula. Se originan las blastosporas que se diseminan en el interior del insecto. Causando la muerte de este. Al fallecer, las hifas del hongo emergen y pueden permanecer en los tejidos superiores del cuerpo, donde pueden volver a esporular.⁽⁹⁾ Todas estas características permiten usar los consorcios de hongos como medidas de biocontrol de la cochinilla.

MÉTODO

Lugar de estudio y ubicación geográfica

Esta investigación fue evaluada bajo condiciones controladas, en los predios de la Universidad Politécnica Salesiana sede Guayaquil.

Toma de la muestra

Las muestras fueron obtenidas de los árboles presentes en la universidad. Se recogieron cochinillas para su identificación y posterior aplicación de los tratamientos.

Recolección de cochinillas

Para la colecta del material entomológico, se realiza un muestreo aleatorio en todo el campus para identificar las cochinillas con características similares a la *Planococcus citri*, para facilitar la recolección se usa un pincel y se sitúan los ejemplares en un envase para su posterior análisis.

Identificación de *Planococcus citri*

Se utilizó un estereomicroscopio para hacer una comparación con las claves taxonómicas correspondientes al espécimen basadas en la caracterización morfológica propuesta por un estudio.

Recolección de *Planococcus citri*

Una vez identificada la *Planococcus citri* mediante estereomicroscopio, se realizó un muestreo focalizado seleccionando las áreas que habían sido analizadas con anterioridad en las cuales se hubo presencia del artrópodo, se determinó en qué plantas había una mayor población de la plaga para facilitar la identificación de sus nidos y la recolección de especímenes. Este proceso de recolección se llevó a cabo durante una semana aproximadamente.

Infección

Para iniciar el proceso de infección, se visualizaron las cochinillas con un estereomicroscopio para identificar la especie (*Planococcus citri*) y seleccionar las cochinillas vivas. Se utilizó la metodología de Buena et al.⁽¹⁹⁾ los cuales recomiendan usar gasa para la aplicación de las cochinillas a la planta. Se separaron en grupos de 20 por cada gasa, con un total de tres gasas por cada planta obteniendo un total de 60 cochinillas por planta, el proceso de infección se completó en aproximadamente 3 días.

Acoplamiento

Una vez que los árboles de *Citrus × aurantiifolia* estuvieron infectados con la *Planococcus citri* se esperó dos semanas a que el insecto se acoplara a la nueva planta hospedera, se controlaron las condiciones para asegurar el éxito del proceso de acoplamiento.

Diseño factorial para la evaluación de la eficacia del consorcio entomopatógenos en *Planococcus citri*

Para la investigación se realiza un diseño factorial completo con 3 factores (tabla 1) y 3 niveles en tratamientos (tabla 2) y concentración de tratamientos, 1 nivel para el control negativo, permitiendo evaluar todos los efectos e interacciones.

- Factor 1: mortalidad: *Planococcus citri* (Variable dependiente)
- Factor 2: tratamientos: T1, T2 y T3
- Factor 3: concentración tratamientos: C1, C2 y C3

Tabla 1. Factor 2 Tratamientos	
Tratamiento	Componentes
T1 (control)	Agua
T2 (control positivo)	Insecticida químico (Detergente potásico)
T3 (unidad experimental)	Consortio (<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Lecanicillium lecanii</i> y <i>Purpureocillium lilacinum</i>).

Tabla 2. Factor 3 Tratamientos			
Factor 3: Concentración		T2	T3
C1	200 %	30,22 p/v	2,0x10 ⁹ conidios/ml
C2	100 %	15,11 p/v	1,0x10 ⁹ conidios/ml
C3	50 %	7,55 p/v	5,0x10 ⁸ conidios/ml
Nota: la concentración en el T1 correspondiente al control negativo es única.			

En el factor 1 presenta un nivel la mortalidad, el factor 2 tres niveles los 3 tratamientos y en el factor 3 siete niveles las 7 diferentes concentraciones por lo cual se requieren 21 plantas de limón *Citrus × aurantiifolia* de entre 4 a 6 meses para la aplicación de los tratamientos en la experimentación.

Aplicación de los tratamientos

Para la aplicación de los tratamientos a las plantas se utilizó equipo de protección completo, incluyendo guantes, botas, máscara y gafas, para evitar cualquier contacto directo con el producto además se realizó la aplicación en un área con ventilación óptima para prevenir la contaminación cruzada (figura 1). Tras la aplicación, se esperó una hora antes de regresar las plantas a las casetas construidas para su protección.

Para la experimentación se construyeron casetas para dar resguardo de depredadores y agentes externos que puedan afectar la muestra, durante este periodo las plantas se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (24 °C) sin recibir luz directa.



Figura 1. Aplicación de los tratamientos

Metodología para el conteo de mortalidad de *Planococcus citri*

Una vez aplicados los tratamientos se tomaron resultados de mortalidad a los 5, 10 y 15 días, el conteo de *Planococcus citri* se realizó de forma manual; se seleccionó de cada una de las plantas una hoja por muestreo al azar para luego ser observada en el estereomicroscopio se examinó toda la superficie de la hoja, incluyendo el anverso, reverso y borde. Donde se dividieron las cochinillas en dos grupos vivas y muertas, los criterios morfológicos para su clasificación fueron las cochinillas vivas deben ser móviles con cuerpo blando las muertas deben estar inmóviles, el cuerpo rígido.

Análisis estadístico

Se realizó la evaluación estadística de los tratamientos calculando el porcentaje de mortalidad de la plaga con la fórmula mencionada. Porcentaje de mortalidad de las cochinillas:

$$\%M = (\text{Nº de insectos muertos}) / (\text{Total de insectos}) \times 100$$

Se calculó la eficacia en relación a la variable número de individuos muertos (mortalidad) de una población homogénea por lo cual se decidió usar la fórmula descrita por Schneider-Orelli (1947).

Porcentaje de eficacia del consorcio entomopatógeno:

$$\%E = \% \text{ de mort. en muestra tratada} - \% \text{ de mort. en muestra testigo } 100 - \% \text{ de mort. en muestra testigo } (100)$$

Donde:

%E= Porcentaje de eficacia.

%mort. en muestra tratada (Porcentaje de mortalidad del T3)

%mort.en muestra testigo (Porcentaje de mortalidad del T1 o T2)

Análisis de Varianza (Anova)

Se usó el software estadístico IBM SPSS Statistic versión 25 para realizar la prueba de homogeneidad, normalidad y ANOVA unidireccional de los datos obtenidos de la mortalidad y para las gráficas se usó las hojas de cálculo de Google.

El análisis de varianza (ANOVA) es una herramienta estadística fundamental en la investigación biológica, ya que permite comparar la influencia de más de 2 factores independientes sobre una variable de interés.⁽¹⁷⁾ En esta investigación la variable a analizar es la mortalidad.

Para poder realizar la prueba de ANOVA unidireccional se debe cumplir 3 requisitos, primero debe haber más de 2 variables independientes, punto número dos deben seguir una distribución normal en cada uno de los grupos, la prueba a utilizar depende del número de muestra si la muestra es menor a 50 como es en nuestro caso se utiliza la prueba de Shapiro- Wilk, como tercer requisito debe existir homogeneidad de varianzas en cada grupo esto se lo puede confirmar con la prueba de Levene.⁽¹⁷⁾

Al interpretar la prueba de ANOVA se debe conocer el p-valor para determinar si es menor a 0,05 y aceptar la hipótesis alternativa que plantea que hay diferencias significativas entre tratamientos en caso de ser mayor a 0,05 se acepta la hipótesis nula que demuestra que no existen diferencias significativas en los tratamientos.⁽¹⁷⁾

Clorofila

Para medir la clorofila se usó el equipo digital AMTAST el cual es un medidor de contenido relativo de clorofila en hojas (unidad SPAD) con un rango de medición de clorofila: 0,0 - 99,9 SPAD es de alta sensibilidad con un intervalo de tiempo de medición es de menos de 3 segundos.

Se llevaron a cabo las mediciones de clorofila de todas las plantas antes y después de las aplicaciones de los tratamientos para luego comprobar si hubieron diferencias significativas en la clorofila de alguno de los tratamientos.

Se calculó el promedio de cada uno de los valores obtenidos por el medidor de clorofila en cada uno de los tratamientos con sus respectivas concentraciones, se aplicaron las pruebas de normalidad y homogeneidad mencionadas anteriormente para luego determinar si hubo diferencias significativas de clorofila en los tratamientos.

Al no cumplir con requisito de homogeneidad no se puede realizar la prueba de ANOVA unidireccional por lo cual se debería aplicar ANOVA de Welch ya que este no se ve afectado por varianzas desiguales, para este análisis se realizó la prueba post hoc de Tukey para correlacionar las medias y ver las diferencias significativas entre los tratamientos.

Al efectuar la prueba de normalidad y homogeneidad de la clorofila se usó el programa IBM SPSS Statistic versión 25, para aplicar el ANOVA de Welch y la prueba post hoc de Tukey se usó la librería *pingouin* (0.5.4) de *Python* versión (3.10).

RESULTADOS

Resultados del acoplamiento con *Planococcus citri* en el limón *Citrus × aurantiifolia*

El proceso de acoplamiento de las cochinillas a las plantas de limón duró dos semanas, luego de ese periodo, se pudo observar formación de varios ovisacos en todas las plantas, además se encontró presencia de melaza el cual refleja que la población estaba activa y establecida (figura 2).

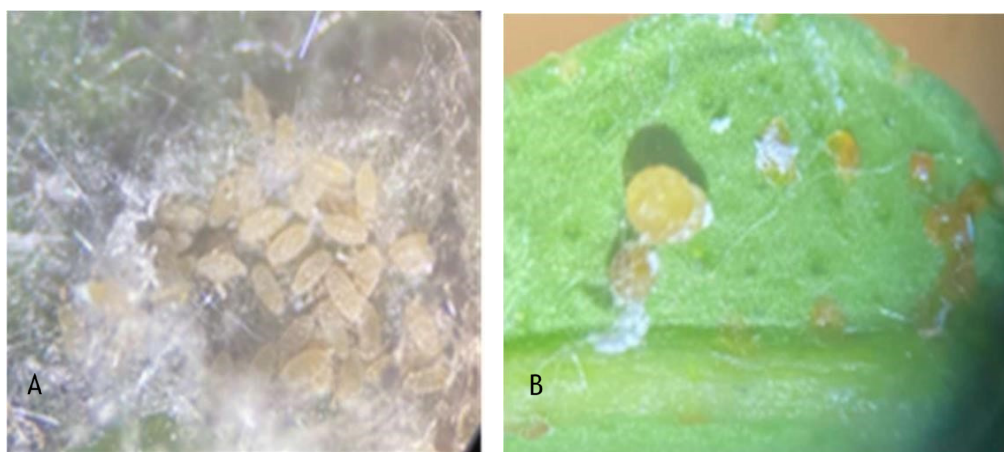


Figura 2. Infección de la cochinilla en la planta de limón; (A) Presencia de ninfas y ovisaco de *Planococcus citri* en la planta de limón *Citrus × aurantiifolia*. (B) Melaza encontrada en las hojas de la planta de limón *Citrus × aurantiifolia*

Mortalidad de las cochinillas *Planococcus citri*

Mortalidad de *Planococcus citri* T3_C1

T3 (HEPs) 2.0×10^9 conidios/ml

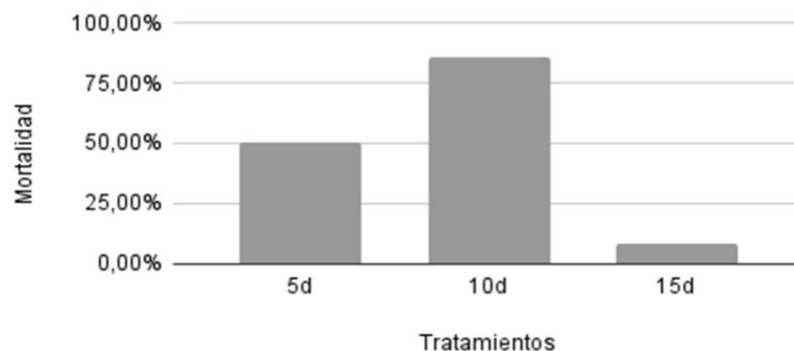


Figura 3. Mortalidad de *Planococcus citri* en tratamiento T3 (HEPs) a concentración de $2,0 \times 10^9$ conidios/ml en los días 5, 10 y 15

El tratamiento 3 correspondiente al consorcio entomopatígeno compuesto por las especies *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* y *Purpureocillium lilacinum* a una concentración de $2,0 \times 10^9$ conidios/ml se observa un promedio total a lo largo de los 15 días de 47,80 % de mortalidad, donde alcanza el punto más alto en el día 10 con un 86 % de mortalidad como se observa en la figura 3.

La unidad experimental en concentración $1,0 \times 10^9$ conidios/ml del tratamiento 3 obtuvo un promedio del 84 % de mortalidad, el mayor porcentaje se obtuvo el día 10 con un 96 % como se muestra en la figura 4.

Mortalidad de *Planococcus citri* T3_C2

T3 (HEPs) 1.0×10^9 conidios/ml

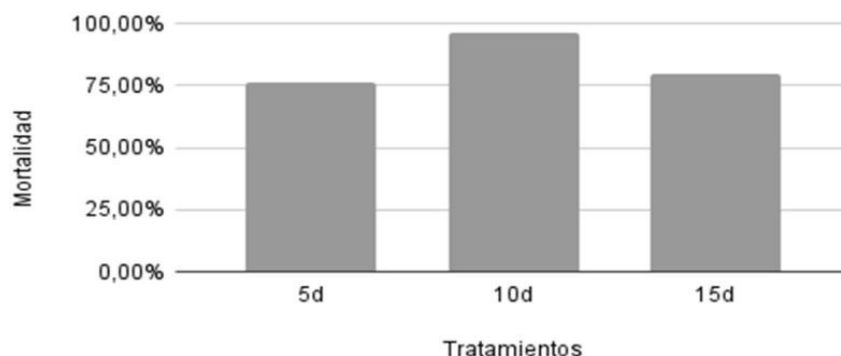


Figura 4. Mortalidad de *Planococcus citri* en tratamiento T3 (HEPs) a concentración de $1,0 \times 10^9$ conidios/ml en los días 5, 10 y 15

El T3 de la concentración $5,0 \times 10^8$ conidios/ml alcanzó su punto máximo de mortalidad el día 15 con un 80 % y con un promedio general de todos los días del 71 % reflejado en la figura 5.

Mortalidad de *Planococcus citri* T3_C3

T3 (HEPs) 5.0×10^8 conidios/ml

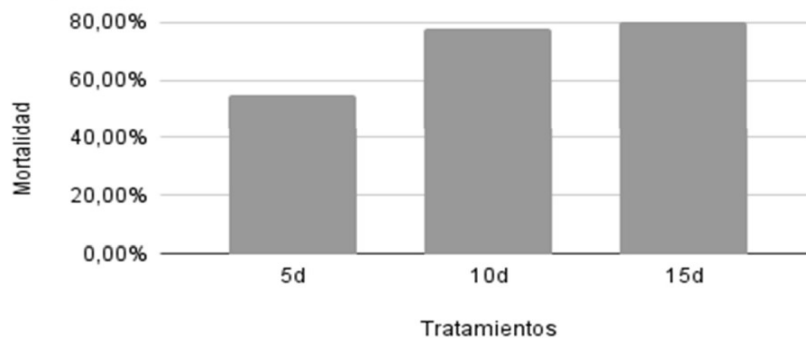


Figura 5. Mortalidad de *Planococcus citri* en tratamiento T3 (HEPs) a concentración de $5,0 \times 10^8$ conidios/ml en los días 5, 10 y 15

El mayor porcentaje de mortalidad lo produjo el tratamiento 3 con concentración de $1,0 \times 10^9$ conidios/ml alcanzando un promedio individual del 84 %, seguido de la concentración $5,0 \times 10^8$ conidios/ml con un 71 %; mientras que el menor porcentaje del tratamiento 3 lo presentó la concentración $2,0 \times 10^9$ con un promedio del 47,80 %.

El análisis de los resultados correspondientes al porcentaje de mortalidad de *Planococcus citri* al evaluar el tratamiento 3 a diferentes concentraciones de las unidades experimentales en el lapso de 15 días alcanzó un promedio total del 67,63 % a diferencia del tratamiento 1 que mostró una mortalidad del 2,5 %.

Estimación de la eficacia de los tratamientos del consorcio entomopatógeno

Según la fórmula descrita por Schneider Orelli para calcular el porcentaje de eficacia de un tratamiento que siguen una distribución normal, se pudo obtener los valores porcentuales de la eficacia de cada uno de los tratamientos T3 (HEPs) en sus tres concentraciones $2,0 \times 10^9$ conidios/ml, $1,0 \times 10^9$ conidios/ml y $5,0 \times 10^8$ conidios/ml como se describe en la figura 6.

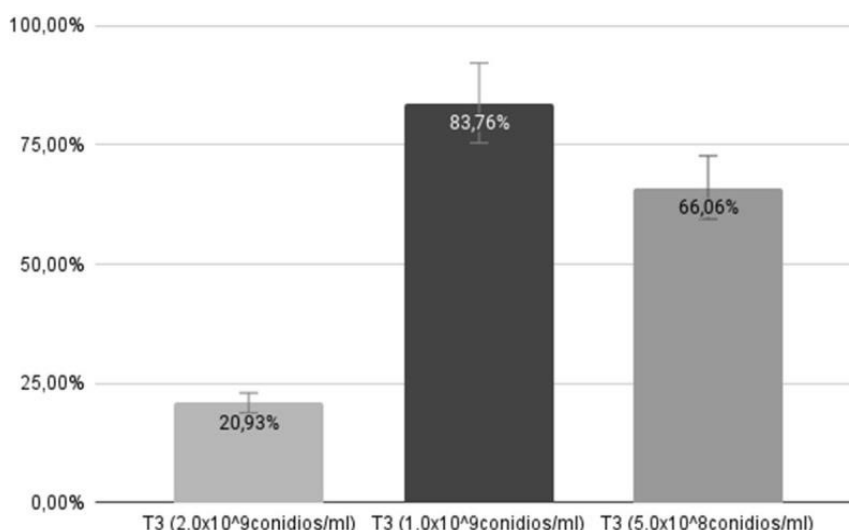


Figura 6. Porcentajes de eficacia de las concentraciones del tratamiento 3

La concentración T3 $1,0 \times 10^9$ conidios/ml demostró el mayor porcentaje de eficacia alcanzando un 83,76 % frente a él T1 control negativo, seguido de la concentración $5,0 \times 10^8$ conidios/ml con un valor cercano del 66,06 % y por último la concentración $2,0 \times 10^9$ conidios/ml tuvo el menor porcentaje de efectividad con un 20,93 %.

Además, se calculó con la fórmula de Schneider Orelli el porcentaje de eficacia de todo el T3 en frente al T1 (control negativo) y el T2 (control positivo) se sacó el porcentaje final de cada uno de los tratamientos para así obtener el nivel de eficacia (figura 7).

Eficacia de T3 (HEPs) con la fórmula Schneider-Orelli.

Porcentaje de eficacia del T3 frente al T2 (control positivo) y T1 (control negativo).

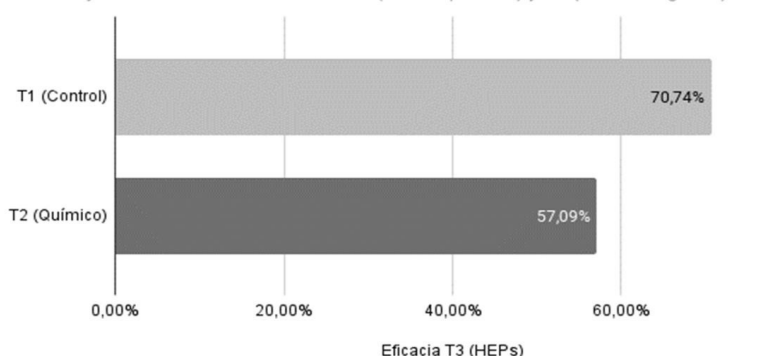


Figura 7. Porcentajes de eficacia del T3 frente a T1 y T2

Los porcentajes mostraron resultados mayores al 50 % en ambos casos, la comparativa con el control negativo el T1 llegó a un 70,74 % de efectividad de todo el T3 (consorcio entomopatógeno) y un 57,09 % de efectividad frente al T2 (control químico).

Comparación de la eficacia de tratamientos T3 y T2

Para comprobar la eficacia del T3 (consorcio entomopatógeno) a través de su mortalidad y compararlo con el control positivo el T2 (detergente químico) a 3 concentraciones en un periodo de 15 días con toma de muestra cada 5 días, se realizaron 18 lecturas: 9

con el consorcio entomopatígeno y 9 con el detergente químico como se puede observar en la tabla 3.

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad de los tratamientos						
Día	T3_C1	T3_C2	T3_C3	T2_C1	T2_C2	T2_C3
5	0,50	0,76	0,55	0,46	0,17	0,35
10	0,86	0,96	0,78	0,51	0,59	0,67
15	0,08	0,80	0,80	0,70	0,23	0

Se realizaron diferentes pruebas estadísticas como la prueba de Shapiro-Wilk y se pudo demostrar que todos los tratamientos siguen una distribución normal como se puede ver en la figura 8. La prueba de Levene fue otra prueba estadística que se realizó para obtener el valor de 0,355 verificando la homogeneidad de las varianzas de cada uno de los grupos (figura 9).

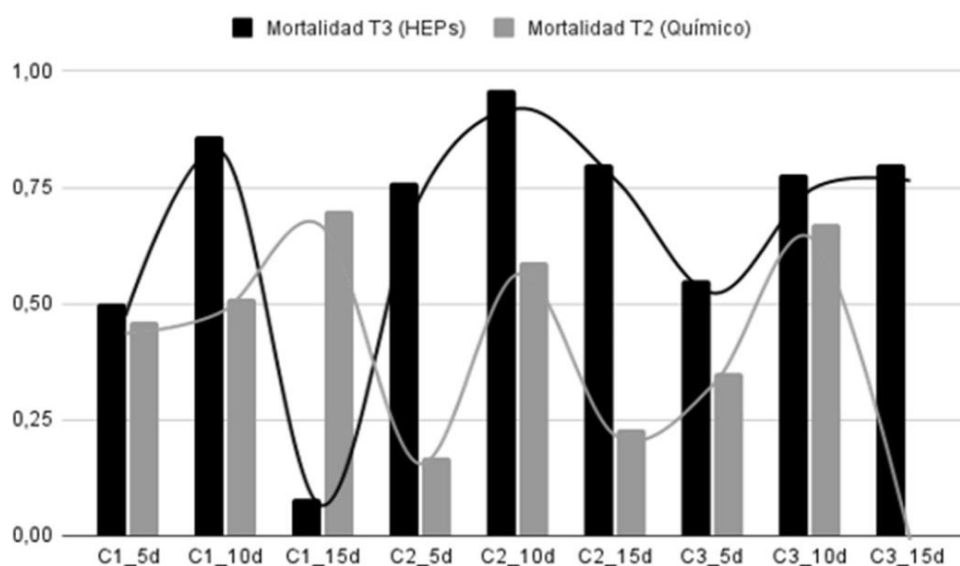


Figura 8. Distribución normal de los tratamientos T2 y T3

ANOVA

Mortalidad					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.620	5	.124	2.052	.143
Within Groups	.726	12	.060		
Total	1.346	17			

Figura 9. Análisis de varianza

En este caso en el análisis de varianza el valor de ($p = 0,143$) demostró que no hay diferencias significativas entre los T2 y T3 en ninguna de las concentraciones, por lo que se descarta la utilización de la prueba post hoc de Tukey.

Mortalidad de las cochinillas *Planococcus citri*

La mortalidad de las cochinillas observadas del grupo control (T1), al igual que el grupo experimental conformado de HEPs (T3) se cuantifican en 3 tomas de forma individual a los 5, 10 y 15 días después de la aplicación del tratamiento 3, para cada muestreo se recolectó una hoja por cada planta infectada, en los siguientes gráficos se muestran los porcentajes de mortalidad del grupo control y el grupo experimental con los datos recopilados.

En la muestra control a lo largo del periodo de 15 días de experimentación con el método antes mencionado únicamente se encontró mortalidad al día 5 de experimentación representado por 10 cochinillas muertas, determinando un 2 % de mortalidad como se detalla en la figura 10.

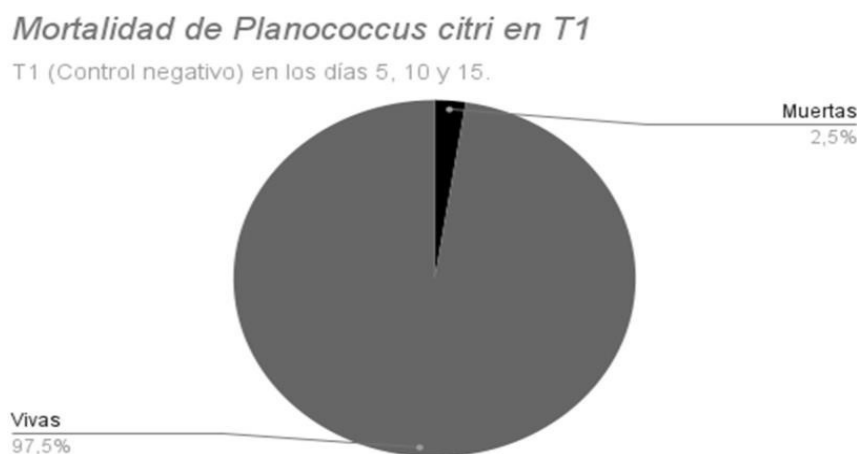


Figura 10. Mortalidad de las cochinillas *Planococcus citri* T1 frente a T3

Comparación de los niveles de clorofila del T1, T2, T3 frente a las plantas antes de su experimentación

Se clasificaron 8 tratamientos, 3 para el T3 (consorcio entomopatógeno), 3 para el T2 control positivo (detergente químico), 1 del T1 de control negativo y 1 para todos los 24 árboles en que se tomaron la cantidad de clorofila antes de cualquier tratamiento.

Se eligió un ANOVA de Welch además se aplicó una prueba de Tukey mediante la librería *pingouin* (0.5.4) de *Python* (3.10). Se conoce que este método ajusta los grados de libertad y las sumas de cuadrados para ver las diferencias en las varianzas entre los grupos no homogéneos, los resultados indican que hay diferencias significativas entre al menos dos grupos de tratamientos, con un valor de p (0,000717). Además, el tamaño del efecto (η^2) es relativamente alto (0,787918), indicando que los tratamientos explican una gran proporción de la variabilidad observada en los datos.

Estos resultados indican las comparaciones específicas entre los tratamientos donde se encontraron diferencias significativas. La interpretación se realiza considerando el p -valor y otras métricas como el Factor de Bayes (BF10) y el tamaño del efecto (Hedges' g).

Se encontró que el tratamiento T3 en concentración C1 ($2,0 \times 10^9$ conidios/ml) demuestra una diferencia significativa entre el y el tratamiento T3 con concentración C3 ($5,0 \times 10^8$ conidios/ml) con un (p -unic = 0,009859) menor a 0,05. Esto sugiere que estos tratamientos tienen un impacto significativamente diferente en la cantidad de clorofila presente en los árboles con tratamientos de diferentes concentraciones.

Se observa una diferencia significativa entre el tratamiento T3 en concentración C1 ($2,0 \times 10^9$ conidios/ml) y el tratamiento T2 con concentración C1 (30,22 p/v) con un valor de (p -unic = 0.031713) el cual implica que los tratamientos tienen un impacto significativamente diferente en la cantidad de clorofila en comparación entre sí.

Existe una diferencia significativa entre el tratamiento T3 en concentración C1 ($2,0 \times 10^9$ conidios/ml) y el tratamiento T2 con concentración C2 (15,11 p/v) con un valor de (p -corr = 0,012579).

Además, se encuentra un valor de (p -corr = 0,008383) demostrando diferencias significativas del T3 en concentración C1 ($2,0 \times 10^9$ conidios/ml) y el tratamiento T2 con concentración C3 (7,55 p/v). A su vez se encontró una diferencia significativa en los niveles de clorofila con un valor de (p -unic = 0,049781) en el tratamiento T3 en concentración C1 ($2,0 \times 10^9$ conidios/ml) y los ejemplares antes del tratamiento.

Se encontraron diferencias significativas en los niveles de clorofila en el tratamiento T1 (control negativo) frente a las muestras antes del tratamiento.

DISCUSIÓN

Aunque existen varios trabajos enfocados en el control biológico de cochinillas, la mayoría se centran en el uso de una cepa de hongo, en lugar de un consorcio entomopatógeno. La relevancia de la declaración previa es que los consorcios muestran interacciones, positivas o negativas, que afectan su eficacia como biocontrol. Por ejemplo, un consorcio compuesto de dos cepas de *Beauveria bassiana*, mostró un 17 % más de mortalidad que los tratamientos usaron cepas individuales; sin embargo, su porcentaje de mortalidad fue bajo: 30 %. Se encontraron metabolitos en los insectos muertos tratados con el consorcio que pueden suprimir el sistema inmune de la oruga.⁽¹⁸⁾ En otra investigación, se determinó que la combinación de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* fue más virulenta que usar cepas individuales, contra plagas insecto de *Momordia charantia*.⁽¹⁹⁾

Los tratamientos de HEPs en cochinillas bajo ambientes de laboratorio controlado suelen mostrar mayor efectividad que los analizados en campo, debido a las condiciones controladas una vez conociendo esto se declara lo siguiente el alto porcentaje de mortalidad que demostraron algunos de los tratamientos en nuestra investigación se infiere que es causado por la correcta aplicación de los mismo, la poca exposición a sus depredadores naturales y diferentes condiciones externas, asegurando así que los tratamientos actuaran sobre la *Planococcus citri*, además se debe considerar que todos los tratamientos estuvieron bajo una temperatura controlada (24 °C) este es un punto a considerar ya que los hongos no tienen un desarrollo adecuado ante temperaturas desfavorables.⁽²⁰⁾

Se sugiere que ese es el motivo de que el tratamiento experimental 3 de (HEPs) tuvo un mayor valor porcentual en su mortalidad a comparación del tratamiento T2 (detergente químico), aunque en niveles de eficacia se pudo demostrar que estadísticamente son iguales.

En el estudio de Buena y colaboradores⁽¹⁹⁾ se demostró mortalidad únicamente en uno de sus productos con un promedio general

del 38,32 % mostrando un mayor nivel de mortalidad el día 14, el segundo y tercer producto de ese estudio no mostraron una mortalidad en la cochinilla (*Nipaecoccus nipae Maskell*) mayor a un 10 % además no mostraron diferencias significativas con el testigo.

A diferencia de los resultados obtenidos en nuestra investigación los cuales mencionan que el tratamiento 3 en todas sus concentraciones genera mortalidad y muestra diferencias significativas con el testigo, las concentraciones de $2,0 \times 10^9$ conidios/ml y $1,0 \times 10^9$ conidios/ml revelan un índice de mortalidad mayor el día 10 llegando a un 86 % y 96 % ese día pero con un promedio general de 47,80 % y 84 % al contrario de la concentración $5,0 \times 10^8$ conidios/ml del consorcio que muestra mayor mortalidad el día 15 alcanzando un 80 % y con un promedio general de todos los días del 71 % nuestro estudio al igual que el de Buena et al.⁽¹⁹⁾ se encontró que la respuesta de la mortalidad de las cochinillas aunque sea en uno de sus tratamientos llegó a su punto máximo después del día 10.

Al igual que los resultados obtenidos, los HEPs muestran una eficacia alta en un estudio basado en el uso de cepas de *Metarhizium anisopliae* y *Metarhizium robertsii* para el control biológico de *Puto barberi* bajo condiciones de laboratorio, que resultó en porcentajes de 75,9 % y 85,4; respectivamente; mientras que, la aplicación de estos HEPs en los almácigos produjo la reducción de la población de cochinillas en 55 % y 78 %. Mostrando que *Metarhizium robertsii* posee una mayor eficacia contra esta cochinilla.⁽²¹⁾

Mejores resultados que los obtenidos se muestran en la investigación de Karaca et al.⁽²²⁾. Bajo condiciones de laboratorio, se analizan cepas individuales de *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Paecilomyces lilacinus*. Se expone que la primera cepa muestra un 100 % de mortalidad al día 5, el segundo y el tercero llegan a un 82 % y un 96 % de mortalidad, respectivamente, al séptimo día.

Una concentración alta de clorofila es signo de la salud de una planta y es un indicador de la tasa de fotosíntesis.⁽²³⁾ Y, la infesta por herbívoros supone una afectación indirecta al crecimiento de una planta por la supresión de actividad fotosintética; en un estudio se determinó que después de 38 días con una infesta inicial alta de cochinillas de la especie *Phenacoccus solenopsis*, del género Pseudococcidae, se mostró una reducción de un 57,3 % en el contenido relativo de clorofila en tomate.⁽²⁴⁾

En estudios recientes, se ha analizado la capacidad endófito de los HEPs. En el trabajo de Veloz-Badillo et al.⁽²⁵⁾ se analiza la capacidad endófito de *Beauveria bassiana*, resultando en no encontrar efectos en la concentración de clorofila (en unidades SPAD). Mientras, la investigación de Greenfield et al.⁽²⁶⁾ muestra una contribución negativa de la concentración del contenido de clorofila en hoja, luego de emplear diferentes concentraciones de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Por otro lado, después de la inoculación en raíces de *Triticum durum* L. cv. Calero (trigo) con *Metarhizium brunneum*, la concentración de clorofila incrementó, pero en hojas jóvenes.⁽²⁷⁾

Mostrando resultados diferentes en el presente trabajo, dado que se muestran diferencias significativas de la concentración de clorofila en hojas entre el tratamiento T3 en concentración C1 comparado con los tres tratamientos empleando el control positivo (detergente químico) y el antes del tratamiento.

CONCLUSIONES

El mayor porcentaje de mortalidad lo produjo el tratamiento 3 con concentración de $1,0 \times 10^9$ conidios/ml alcanzando un promedio individual del 84 % en todo el tiempo de experimentación. El consorcio muestra mayor mortalidad contra el control negativo y control positivo.

Las concentraciones altas en el tratamiento 3 demostraron un efecto letal a corto plazo y en concentración baja mostró un mayor grado de mortalidad al día 15, indicando un efecto gradual de letalidad.

Se reveló que en términos de eficacia el tratamiento 2 correspondiente al control positivo y el tratamiento 3 del consorcio de hongos entomopatógenos son estadísticamente iguales a lo largo del periodo de experimentación.

El tratamiento correspondiente al consorcio de hongos entomopatógeno demostró ser una alternativa eficaz al insecticida químico para el control de *Planococcus citri*, debido a que se observó una mayor mortalidad de la plaga y una reducción significativa de la población con el uso del tratamiento frente al control negativo y el control positivo.

El tratamiento 3 concentración $2,0 \times 10^9$ conidios/ml demostró un aumento significativo con el nivel de clorofila de todos los tratamientos 2, con el tratamiento 3 concentración $5,0 \times 10^8$ conidios/ml y con el porcentaje de clorofila antes de la aplicación de los tratamientos, concluye que la presencia de hongos puede ser un factor estimulante para la síntesis de clorofila.

FINANCIACIÓN

Los autores no recibieron financiación para el desarrollo de la presente investigación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORÍA

Conceptualización: Solange del Rocío Lituma Carriel.

Curación de datos: Solange del Rocío Lituma Carriel.

Análisis formal: Solange del Rocío Lituma Carriel.

Redacción – borrador original: Solange del Rocío Lituma Carriel.

Redacción – revisión y edición: Solange del Rocío Lituma Carriel.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ghaffari S, Karimia J, Kamali S, Mahdikhani Moghadam E. Biocontrol of *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae) by *Lecanicillium longisporum* and *Lecanicillium lecanii* in laboratory and greenhouse conditions. *J Asian Pac Entomol*. 2017;20(2):605-12.
2. Modafferi A, Ricupero M, Mostacchio G, Latella I, Zappalà L, Palmeri V, et al. Bioactividad de la nanoemulsión a base de aceite esencial de *Allium sativum* contra *Planococcus citri* y su depredador *Cryptolaemus montrouzieri*. *Ind Crops Prod*. 2024;208.
3. Mansour R, Belzunces LP, Suma P, Zappalà L, Mazzeo G, Grissa-Lebdi K, et al. Vine and citrus mealybug pest control based on synthetic chemicals. A review. *Agron Sustain Dev*. 2018;38(37):1-18.
4. Herrick NJ, Cloyd RA, Raudenbush AL. Systemic insecticide applications: Effects on citrus mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) populations under greenhouse conditions. *J Econ Entomol*. 2019;112(4):1048-54.
5. Zambrano A. Gracias al tratamiento contra la cochinilla, los árboles de Urdesa recuperan su follaje. *Alcaldía de Guayaquil*. 2023.
6. Khan S, Guo I, Maimaiti Y, Mijit M, Qiu D. Hongos entomopatógenos como agente de biocontrol microbiano. *Biotechnol Mol Plant Breed*. 2012;3:63-79.
7. Valbuena Puentes AH, Galindo Soracá AM, Boyacá Quintana YM. Efecto del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (balsamo) Vuillemin en el control de la oveja ked (*Melophagus ovinus*). *Rev Investig Vet Peru*. 2021;32(2):e18362.
8. Acheampong MA, Coombes CA, Moore SD, Hill MP. Temperature tolerance and humidity requirements of select entomopathogenic fungal isolates for future use in citrus IPM programmes. *J Invertebr Pathol*. 2020;174:107436.
9. Gómez Ramírez H, Zapata Granja A, Torres Del Águila E, Tenorio Cantoral M. Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. Laboratorio de Entomopatógenos SCB - SENASA; 2014.
10. Shin H, Lee S, Lee J. Molecular mechanisms of fungal entomopathogens. *J Microbiol Biotechnol*. 2020;30(10):2129-40.
11. Abdollahdokht D, Gao Y, Faramarz S, Ghasemi H. Conventional agrochemicals towards nano-biopesticides: an overview on recent advances. *Chem Biol Technol Agric*. 2022;9(2):120.
12. Laudani F, Campolo O, Caridi R, Latella I, Modafferi A, Palmeri V, et al. Based Nano-Insecticide. *Insects*. 2022;13(12):1150.
13. Carvalho MMP, Corrêa Reis LA, Pinheiro MLC, Moreira MM, Vieira DA, Souza B. Is a diet of *Planococcus citri* nymphs and adults suitable for *Chrysoperla externa* for use in biological control?. *Rev Bras Entomol*. 2023;67(1):e20220010.
14. Daane KM, Almeida RPP, Bell VA, Walker JTS, Botton M, Fallahzadeh M, et al. Biology and Management of Mealybugs in Vineyards. In: *Arthropod Management in Vineyards*. Dordrecht: Springer; 2012. p. 271-307.
15. Mani M, Shivaraju C. Mealybugs and their management in agricultural and horticultural crops. Springer; 2016.
16. Kim BS, Park Min-Goo, Gil-Hah Kim, Jeong-Oh Yang. Development of a Concurrent Treatment Technique of Ethyl Formate and Mixtures (Nitrogen, Phosphine) to Control Citrus Mealybug (*Planococcus citri*). *Insects*. 2023;14(9):720.
17. Azizi F, Ghasemi R, Ardalan M. Dos errores comunes al aplicar la prueba ANOVA: Guía para investigadores biológicos. Preprints. 2022.
18. Da Costa Stuart AK, Furuie JL, Cataldi TR, Stuart RM, Zawadneak MAC, Labate CA, et al. Metabolomics of the interaction between a consortium of entomopathogenic fungi and their target insect: Mechanisms of attack and survival. *Pestic Biochem Physiol*. 2023;191:105369.
19. Naveeda S. Microbial consortium for the management of insect pest pf bitter brourd (*Momordica charantia* L.). [Vellayani]: Department of Agricultural Entomology College of Agriculture; 2018.
20. Cloyd R, Herrick N. Are Entomopathogenic Fungal-based Insecticides and Insect Growth Regulator Mixtures Effective Against the Citrus Mealybug, *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae), Feeding on *Coleus*, *Solenostemon scutellarioides*, Plants under Greenhouse Conditions?. *HortScience*. 2023;58(10):1225–9.

21. Góngora CE, Gil-Palacio ZN. Control biológico de cochinillas de las raíces del café con hongos entomopatógenos. *Cenicafe*. 2020;71(2):53–65.
22. Karaca G, Kayahan A, Şimşek B, Karaca İ. Effects of some entomopathogenic fungi on Citrus Mealybug *Planococcus citri* (Risso) (Hemiptera: Pseudococcidae). *Entomologica*. 2016;47:39-44.
23. Mohesh M, Basumatary M. Estimation of the chlorophyll concentration in seven Citrus species of Kokrajhar district, BTAD, Assam, India. *Trop Plant Res*. 2018;5(1).
24. Huang J, Zhang P, Zhang J, Lu Y, Huang F, Li M. Chlorophyll Content and Chlorophyll Fluorescence in Tomato Leaves Infested With an Invasive Mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Environ Entomol*. 2013;42(5):973-9.
25. Veloz-Badillo GM, Riveros-Ramírez J, Angel-Cuapio A, Arce-Cervantes O, Flores-Chávez B, Espitia-López J, et al. The endophytic capacity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* caused inherent physiological response in two barley (*Hordeum vulgare*) varieties. *3 Biotech*. 2019;9(1):12.
26. Greenfield M, Gómez-Jiménez MI, Ortiz V, Vega FE, Kramer M, Parsa S. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biol Control*. 2016;95:40–8.
27. González-Guzmán A, Sacristán D, Sánchez-Rodríguez AR, Barrón V, Torrent J, Del Campillo MC. Soil Nutrients Effects on the Performance of Durum Wheat Inoculated with Entomopathogenic Fungi. *Agronomy*. 2020;10(4):589.