

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR  
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS**

**Determinación de compuestos volátiles en dos Rutáceas y su  
interacción con *Diaphorina citri* (Hem.: Liividae) vector del HLB  
(Huanglongbing)**

Trabajo Final de Graduación bajo la modalidad de tesis para optar al grado de Licenciatura en  
Ingeniería Agronómica

**Estudiante**

**Eduardo Alvarado Echeverría**

**Tutor:**

**PhD. Ing. Francisco González Fuentes**

**Asesores:**

**M. Sc. Ing. Allan González Herrera**

**M. Sc. Ing. Alejandro Vargas Martínez**

**Campus Omar Dengo**

**Heredia, Costa Rica, 2021**

**Determinación de compuestos volátiles en dos Rutáceas y su interacción con *Diaphorina citri* (Hem.: Liividae) vector del HLB (Huanglongbing)**

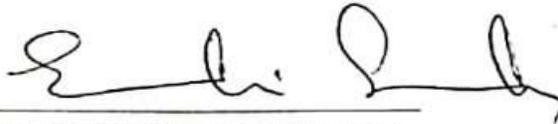
**Eduardo Alvarado Echeverría**

Trabajo final de graduación de tesis sometido a consideración del  
Tribunal Examinador de la  
Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional para optar al grado de  
Licenciatura en Ingeniería Agronómica  
Trabajo final de Graduación presentado como requisito parcial para optar al grado  
de Licenciatura en Ingeniería Agronómica

TRIBUNAL EXAMINADOR



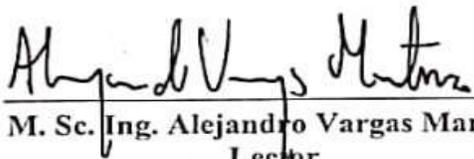
Dr. Carlos Eduardo Hernández Aguirre  
Representante Decanato FCTM



Dr. Evelio Granados Carvajal  
Director (a) Escuela de Ciencias Agrarias



PhD. Ing. Francisco González Fuentes  
Tutor



M. Sc. Ing. Alejandro Vargas Martínez  
Lector



M. Sc. Ing. Allan González Herrera  
Lector



Bach. Eduardo Alvarado Echeverría  
Postulante

## **DEDICATORIA**

A Dios y a Nuestra Madre Santísima; por su guía y compañía.

A mi esposa Natalia e hijo Juan Pablo, pilares enormes en mi vida, motivo para el esfuerzo diario y mantener el rumbo orientado hacia la mejora constante.

A mis padres por darnos el mejor ejemplo para construir pieza por pieza lo que hoy somos y logramos.

A mis hermanas y hermano por ser parte del equipo que refuerzan los valores y buenas costumbres.

Por supuesto a la familia de mi esposa por ser tan buena compañía en los caminos de esta hermosa vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A todas las personas que de muchas maneras aportaron para concluir el ciclo de este proyecto.

Profundo agradecimiento a mi tutor PhD. Ing. Francisco González Fuentes, por su guía, su versatilidad, experiencia y sabiduría para encausar este trabajo; sobre todo, su gran sentido de colaboración y compromiso.

A M. Sc. Ing. Alejandro Vargas Martínez y M. Sc. Ing. Allan González Herrera que aceptaron formar parte del equipo desde un principio y contribuyeron en el proceso de este trabajo. Su apoyo, consejos y observaciones en momentos oportunos han sido de gran valor y aprendizaje.

## I. RESUMEN

La presente investigación se desarrolló con el objetivo de identificar y analizar el perfil de compuestos orgánicos volátiles en plantas de naranja dulce (*Citrus sinensis*) y plantas de murraya (*Murraya paniculata*), con y sin la presencia de adultos y ninfas de *Diaphorina citri*, para seleccionar los compuestos candidatos con potencial atrayente y evaluar en una prueba de campo su efectividad como herramienta para el monitoreo de *D. citri*. Se seleccionaron grupos de plantas de naranja dulce y murraya producidas en condiciones controladas para ser inoculadas en jaulas forradas con malla antiáfidos, con adultos de *D. citri*, obtenidos de un pie de cría también desarrollado en ambiente protegido. Una vez que los adultos colocaron huevos y hubo desarrollo de ninfas, se procedió a tomar plantas que se ubicaron en cajones de vidrio y utilizando una bomba de aire y sistema de filtros se capturaron los compuestos volátiles presentes en cada muestra. Los filtros con el extracto fueron enviados al laboratorio de ChemTica para la identificación respectiva. Terminada la fase de identificación de los compuestos volátiles, se seleccionaron los de mayor potencial y fueron utilizados para confeccionar los señuelos de las pruebas de campo con trampas pegajosas amarillas. Se incluyeron 3 tratamientos en los cuales se evaluó una feromona, una kairomona, una mezcla de ambas más un tratamiento testigo. El estudio evaluó el efecto de los tratamientos, el comportamiento de las capturas durante las fechas y la interacción entre ambos factores. En las pruebas de extracción se identificaron 40 compuestos volátiles, de los cuales fueron seleccionados el p-cimeno y el ácido propanoico para evaluar el potencial atrayente de *D. citri*. Los resultados mostraron diferencias significativas para el factor fecha, no así para el factor tratamiento ni tampoco para la interacción entre ambos.

## II. ABSTRACT

The present research was developed with the aim of identifying and analyzing the profile of volatile organic compounds in sweet orange plants (*Citrus sinensis*) and murraya plants (*Murraya paniculata*), with and without the presence of adults and nymphs of *Diaphorina citri*, to select the candidate compounds with attractive potential and evaluate in a field trial their effectiveness as a tool for monitoring this specie of insect. Groups of sweet orange and murraya plants produced under controlled conditions were selected to be inoculated in cages lined with antiaphid mesh, with adults of *D. citri*, obtained from a brood foot also developed in a protected environment. Once the adults laid eggs and nymphs had developed, we proceeded to take plants that were placed in glass drawers and using an air pump and filter system, to capture the volatile compounds present in each sample. The filters with the extraction were sent to the ChemTica laboratory for the respective identification. After the identification phase of the volatile compounds, the ones with the greatest potential were selected and used to make the lures of the field tests together with yellow sticky traps. We included 3 treatments in which a pheromone, a kairomona, a mixture of both plus a control treatment was evaluated. The study evaluated the effect of the treatments, the behavior of catches during the dates and the interaction between both factors. In the extraction tests, 40 volatile compounds were identified, from which p-cymene and propanoic acid were selected to evaluate the attractive potential of *D. citri*. The results showed significant differences for the date factor, not for the treatment factor nor for the interaction between both.

### III. TABLA DE CONTENIDO

I.	RESUMEN .....	6
II.	ABSTRACT.....	7
III.	TABLA DE CONTENIDO .....	8
IV.	LISTA DE CUADROS.....	10
V.	LISTA DE FIGURAS.....	11
VI.	INTRODUCCIÓN.....	12
VII.	OBJETIVOS .....	15
A.	Objetivo general.....	15
B.	Objetivos específicos .....	15
VIII.	MARCO TEÓRICO.....	16
A.	Citricultura mundial.....	16
B.	Enfermedad del HLB .....	17
C.	<i>D. citri</i> , vector del HLB.....	17
D.	Manejo del vector.....	20
1.	<b>Manejo Cultural .....</b>	<b>20</b>
2.	<b>Control Biológico .....</b>	<b>20</b>
3.	<b>Manejo Químico.....</b>	<b>21</b>
E.	La ecología química y papel de los compuestos volátiles.....	21
IX.	METODOLOGÍA.....	27
A.	Ubicación del estudio.....	27
B.	Procedencia de plantas y pie de cría de <i>D. citri</i> .....	27
C.	Fase 1 (Invernadero y laboratorio). Determinación de los compuestos volátiles liberados por plantas atacadas por <i>D. citri</i> .....	28
1.	<b>Objetivo.....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
2.	<b>Procedimiento.....</b>	<b>28</b>
D.	Variables.....	31
E.	Análisis estadístico.....	31
F.	Fase 2 (Campo). Evaluación en campo de los compuestos atrayentes o repelentes seleccionados.....	31
1.	<b>Objetivo .....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
2.	<b>Procedimiento.....</b>	<b>31</b>

3.	<b>Variables.....</b>	<b>33</b>
4.	<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>33</b>
X.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>35</b>
A.	Composición química de extracción de compuestos orgánicos volátiles en <i>Citrus sinensis</i> y <i>Murraya paniculata</i> en plantas con y sin inoculación de poblaciones de <i>D. citri</i> . 35	
B.	Dinámica en captura de adultos de <i>D. citri</i> en pruebas de campo. ....	44
C.	Efecto de la precipitación sobre las capturas de <i>D. citri</i> .....	45
D.	Efecto de los tratamientos sobre la captura de <i>D. citri</i> . ....	46
XI.	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>51</b>
XII.	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>52</b>
XIII.	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>53</b>

#### IV. LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Tratamientos establecidos para la prueba de campo.....	33
<b>Cuadro 2.</b> Identidad y frecuencia de aparición de compuestos orgánicos volátiles detectados en las muestras analizadas de Naranja y Murraya con y sin interacción de colonias de <i>D. citri</i> .....	35
<b>Cuadro 3.</b> Valores medios de los tiempos de retención y % de similaridad de los compuestos volátiles en muestras de naranja y murraya con o sin <i>D. citri</i> .....	40
<b>Cuadro 4.</b> Valores medios y desviación estándar de los tiempos de retención de cinco compuestos volátiles seleccionados en muestras de naranja y murraya con o sin <i>D. citri</i> ...	41
<b>Cuadro 5.</b> Compuestos volátiles con frecuencia significativa y sus familias compuestas, presentes en naranja y murraya con o sin <i>D. citri</i> .....	42

## V. LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A) Adulto de <i>D. citri</i> con su cuerpo en posición de 45° alimentándose del tallo de un cítrico, B) Hembra y C) Macho (Cicero Jurado <i>et al.</i> , 2017) .....	18
<b>Figura 2.</b> Estadios de desarrollo de <i>D. citri</i> . A) Huevos, B) Ninfas de 1er instar, C) Ninfa de 2d instar, D) Ninfa de 3er instar, E) Ninfa de 4to instar y F) Ninfa de 5to instar (Cicero Jurado <i>et al.</i> , 2017) .....	19
<b>Figura 3.</b> Equipo para colección de volátiles.....	29
<b>Figura 4.</b> Modelo de colocación de trampas amarillas utilizadas para el monitoreo de <i>D. citri</i> en cítricos.....	32
<b>Figura 5.</b> Cromatograma de captura de volátiles de una de las muestras para naranja sin <i>D. citri</i> .....	36
<b>Figura 6.</b> Cromatograma de captura de volátiles de una de las muestras para naranja con <i>D. citri</i> .....	36
<b>Figura 7.</b> Cromatograma de captura de volátiles de una de las muestras para Murraya sin <i>D. citri</i> .....	37
<b>Figura 8.</b> Cromatograma de captura de volátiles de una de las muestras para Murraya con <i>D. citri</i> .....	37
<b>Figura 9.</b> Captura de adultos de <i>D. citri</i> por tratamiento y por fecha de muestreo.....	45
<b>Figura 10.</b> Captura de adultos de <i>D. citri</i> por tratamiento y curva de precipitación.....	46
<b>Figura 11.</b> Medias ajustadas y error estándar de la captura de <i>D. citri</i> por fecha.....	48
<b>Figura 12.</b> Resultados globales de la captura de <i>D. citri</i> por tratamiento .....	50

## VI. INTRODUCCIÓN

La citricultura es una actividad de gran importancia social y económica a nivel mundial debido a la cantidad de empleos que genera, a su volumen de producción y precio en el mercado. En el 2018, mantenía una producción aproximada de 96 200 000 toneladas métricas, enfocada principalmente en naranja (53%), mandarina (31%), limón (9%) y toronja (7%) (Citrus, 2018).

En el caso de América Latina y el Caribe, según datos de 2018, alcanzó una superficie cultivada de 2 329 815 hectáreas, con una producción total de 45 601 395 toneladas, lo que la convierte en una parte importante en la economía de la mayoría de los países de la región (FAO, 2020).

En Costa Rica hay sembradas unas 24 000 hectáreas de naranja y unas 3 000 hectáreas de otros cítricos como mandarinas, limones ácidos y dulces, pomelos y toronjas (FAO, 2020). La zona Norte y La Cruz de Guanacaste representan el 75% del área sembrada y el 90% de la producción se destina para la producción de jugo concentrado congelado, el restante 10% se comercializa como fruta fresca en los mercados tradicionales (Acuña, 2012).

Uno de los principales retos que enfrenta la citricultura mundial es la amenaza del Huanglongbing o HLB (Bové, 2006); ocasionada por la bacteria *Candidatus Liberibacter spp* y vectorizada por el insecto *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera). Esta enfermedad es considerada el problema fitosanitario más devastador de los cítricos, debido a los daños directos que ocasiona en plantas y frutos, la dificultad de su diagnóstico temprano, su mecanismo de dispersión a través de vectores, al rápido aumento del nivel de incidencia en huertos infectados, y a los elevados costos económicos y ambientales de su manejo (Santivañez C, Mora Aguilera, Díaz Padilla, López Arrollo, & Vernal Hurado, 2013).

Las estrategias utilizadas actualmente se enfocan en la producción de árboles libres de dicha bacteria desde la etapa de vivero, la erradicación de árboles enfermos en las

plantaciones, así como el monitoreo y manejo del vector, el cual se realiza principalmente mediante productos químicos y en menor medida con control biológico (Mora *et al.*, 2016).

Las prácticas utilizadas no han sido eficaces en la prevención y propagación de la enfermedad y tienen inconvenientes asociados, como inducción de resistencia, consecuencias negativas para la entomofauna benéfica y para el medio ambiente e inducción de plagas secundarias que desestabilizan el equilibrio biológico de los agroecosistemas. De tal manera que, el desarrollo de alternativas efectivas para el manejo del vector sigue siendo un asunto de vital importancia (Onagbola, Rouseff, Smoot & Stelinski, 2011).

El monitoreo de *D. citri* se considera una herramienta indispensable para el manejo del vector y de la enfermedad. El uso de trampas amarillas pegajosas ha sido ampliamente utilizado, con efectividad variable dependiendo de la densidad poblacional de la plaga; Amorós, Pereira das Neves, Rivas, Buenahora, Martini, Stelinski & Rossini, (2019), mencionan: “por ejemplo, Miranda *et al.*, (2018) mostró que, las trampas pegajosas fueron un método eficaz para detectar *D. citri* a bajas densidades; mientras que resultados opuestos fueron informados por Godfrey *et al.*, (2013), bajo densidades similares de la plaga, al comparar múltiples métodos de monitoreo de la misma”. Así mismo, Díaz Gil, Fernández Argudín, Cuñarro Cabeza, & Méndez Barceló, (2019), al comparar trampas pegajosas de diferentes colores, concluyeron que el color de trampa preferido por los adultos de *D. citri* fue el amarillo.

Algunos autores como Bouvet & Hochmaier (2018), consideran al uso de trampas amarillas y recomiendan su uso a una densidad de una trampa por ha; no obstante, Belasque Jr., Takao Yamamoto, Pedreira de Miranda, Beozzo Bassanezi, Juliano Ayres & Bové (2010), aclaran que el número de trampas por área dependerá de la cantidad de adultos capturados en trampas próximas entre sí, indicando que a mayor variabilidad mayor número de trampas.

La reducción de las poblaciones de *D. citri* es un componente clave en la gestión del HLB, por lo cual, la identificación de atrayentes potenciales del vector, como los compuestos

volátiles, podría ser útil para su manejo. Para aumentar la captura de *D. citri*, en trampas pegajosas amarillas, los señuelos (lures) son muy necesarios, y el uso de volátiles de la planta huésped podría aumentar el atractivo de las trampas para monitorear la actividad de adultos y facilitar el desarrollo de tecnologías atrayentes (Amorós *et al.*, 2019).

De acuerdo con Amorós *et al.*, 2019, actualmente existe un gran esfuerzo de investigación dirigido a encontrar atrayentes o repelentes para el vector. Existen referencias de investigación relacionadas con los compuestos volátiles liberados por hospederos y no hospederos de la plaga como, por ejemplo, Onagbola *et al.*, (2010); Mann, Rouseff, Smott, Castle, & Stelinski, (2011); Patt & Sétamou (2010), Coutinho Abreu, Forster, Guda, & Ray (2014); Fancelli, Borges, Laumann, Pickett, Birkett & Blassioli, (2018); Amorós *et al.*, (2019), con diferentes rangos de efectividad.

Zhao, Wang, Zeng, & Xue (2013), evaluaron las respuestas de *D. citri* a brotes jóvenes sanos e infectados con *Ca. Liberibacter*, buscando respuestas a las diferencias en el comportamiento hacia la selección del hospedero, sin embargo, aún no se ha tomado en cuenta la identificación de compuestos volátiles inducidos directamente por la presencia de adultos o ninfas de *D. citri* en brotes de sus hospederos cítricos, que pudieran tener efectos atrayentes o repelentes para el mismo. De la misma manera, en Costa Rica, se han realizado pesquisas relacionadas con volátiles en cítricos; no obstante, no existe ningún tipo de información documentada relacionada con este tema.

Este trabajo, tiene como objetivo obtener e identificar compuestos volátiles a partir de naranja dulce (*Citrus sinensis*) y Mirto (*Murraya paniculata*) en presencia de *D. citri* y evaluar su potencial uso como atrayentes; convirtiéndose en una posible herramienta que favorezca a la citricultura en general para el monitoreo y manejo del vector y por ende del HLB.

## VII. OBJETIVOS

### A. Objetivo general

- Evaluar compuestos volátiles con potencial atrayente para *D. citri* mediante el análisis de dos rutáceas con presencia de la plaga como herramienta alternativa para el manejo integrado del vector.

### B. Objetivos específicos

- Analizar compuestos volátiles presentes en *M. paniculata* y *C. sinensis* con y sin adultos y ninfas de *D. citri* mediante cromatografía de gases pareado con espectrómetro de masas y compararlos con lo encontrado en la literatura.
- Verificar el potencial de los compuestos seleccionados en una prueba de campo, incorporados a trampas pegajosas amarillas.

## VIII. MARCO TEÓRICO

### A. Citricultura mundial.

Los cítricos comprenden un gran grupo de plantas del género *Citrus* y otros géneros afines (*Fortunella* y *Poncirus*) o híbridos de la familia Rutaceae, representado en su mayoría por naranjas, mandarinas, limones, limas (ácidas y dulces), pomelos, cidras y toronjas. Son originarios principalmente, de las regiones Subtropicales y Tropicales desde China hasta Japón, del Sudeste de Asia, incluyendo áreas del Este de la India, Bangladesh, Filipinas, Indonesia, Australia y África (Araújo Crisostomo & Nawmov, 2009).

Estas plantas perennes presentan características mesofíticas (yemas casi desnudas, hojas largas, poco gruesas, con estomas superficiales, ausencia de pelos y cutícula fina) y perennifolia (tiene hojas todo el año, desarrollando flujos de crecimiento vegetativo). Son cultivadas en varias regiones del mundo, adaptándose a las diferentes condiciones edafoclimáticas, siempre y cuando el manejo del riego y la nutrición sean adecuados (Araújo Crisostomo & Nawmov, 2009).

En Costa Rica, las zonas productoras son la Central Sur, Central Occidental, Chorotega, Brunca, Huetar Norte y Huetar Atlántica. Según la “Encuesta Nacional Agropecuaria, 2019”, la producción estimada fue de 166 000,6 toneladas métricas. Los principales destinos de la producción de este cultivo fueron el autoconsumo 55,3%, la venta 42,2%, de la cual el 66,5% se destinó a la industria (Censos, 2019). El área estimada de cítricos es de 25 785 hectáreas aproximadamente (FAO, 2020).

La citricultura es una actividad de gran importancia social y económica a nivel mundial debido a la cantidad de empleos que genera, a su volumen de producción y precio en el mercado. Sin embargo, se enfrenta al ataque de diversas plagas y enfermedades durante todo el proceso de producción, como la clorosis variegada de los cítricos, la mancha grasienta en hoja, la melanosis, el “PFD” (post-blomm fruit drop) o enfermedad de la caída de frutos, entre otras.

## **B. Enfermedad del HLB**

Actualmente, la enfermedad conocida como HLB (Huanglongbing) provocada por la bacteria *Ca. Liberibacter* spp., y transmitida por sus insectos vectores *D. citri* y *Trioza erytreae*, representa una seria amenaza pues las plantas o árboles infectados mueren a los pocos años (Cicero Jurado, Lomas Barrié, Loeza Kuk, Sánchez Borja, & Arredondo Bernal, 2017). *Ca. Liberibacter* es una bacteria gramnegativa y restringida al floema, de cuyo género se conocen tres especies, *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter africanus*, y *Ca. Liberibacter americanus* (Bové, 2006)

El nombre de cada especie de dichas bacterias se basó en su presunto origen. Se cree que *Ca. Liberibacter asiaticus* se originó en Asia, *Ca. Liberibacter americanus*, en las Américas y *Ca. Liberibacter africanus* en África; entre estas tres especies, *Ca. Liberibacter asiaticus*, es la que se encuentra más ampliamente distribuida y transmitida en todo el mundo, mientras que *Ca. Liberibacter africanus* se encuentra solo en África (Lin, Pietersen, Han, Alan Reid, Lou, Gupta & Civerolo, 2015). Prácticamente todas las especies y cultivares de cítricos comerciales son sensibles a la enfermedad, independientemente del patrón o porta injertos. Es conocido que la forma de HLB africana es sensible al calor y se desarrolla entre los 22-25 °C, y por su lado la forma asiática es tolerante al calor, soportando temperaturas superiores a los 30°C (Bové, 2006).

### **C. *D. citri*, vector del HLB.**

*Diaphorina citri*, es un insecto que se alimenta del floema y es oligófago en plantas rutáceas. De acuerdo con la clasificación realizada por Burckhardt & Ouvrard (2012) es un hemiptero que se incluyó en la familia Liviidae, de la cual, once especies tienen como hospederos a miembros de la familia Rutaceae.

Este vector, es un insecto chupador que inserta sus partes bucales en tejidos vegetales para alimentarse; los adultos se alimentan en los tallos jóvenes y en las hojas de todas las etapas de desarrollo, aunque principalmente de los brotes tiernos; los adultos miden de 2.7 a 3.3 mm de largo y sus alas son de color marrón moteado. También pueden encontrarse en descanso o alimentándose de las hojas con la cabeza en la superficie de las hojas (haz) y su

cuerpo formando un ángulo de 45° (Figura 1A). La hembra se caracteriza por tener un abdomen en forma puntiaguda (Figura 1B), mientras que el macho se caracteriza por la forma redondeada del extremo del abdomen (Figura 1C) (Cicero Jurado *et al.*, 2017).



**Figura 1. A) Adulto de *D. citri* con su cuerpo en posición de 45° alimentándose del tallo de un cítrico, B) Hembra y C) Macho (Cicero Jurado *et al.*, 2017).**

El ciclo de vida de *D. citri* se resume en: etapa de huevo seguido de cinco instares ninfales y adultos. Las hembras de *D. citri*, colocan sus huevos en el tejido terminal (brotes) incluyendo pliegues de hojas, pecíolos, yemas axilares, superficie superior e inferior de hojas jóvenes y tallos tiernos. Los huevos recién depositados son de color amarillo claro, y se tornan color naranja brillante cuando maduran o antes de eclosionar (Tsai & Hong Liu, 2000).

Las ninfas son elípticas, planas en su parte ventral y convexo por la dorsal, su coloración va desde el amarillo en los primeros instares ninfales, pasando por el verde, hasta el gris al final de su desarrollo. Presentan característicos filamentos cerosos en sus bordes. Las ninfas de primer instar miden alrededor de 0.25 mm de longitud (Figura 2B), mientras que las de quinto pueden alcanzar hasta 1.7 mm, además de presentar cojinetes alares abultados (Figura 2F). Las ninfas a pesar de que presentan un comportamiento sedentario pueden llegar a desplazarse entre los brotes de sus plantas hospederas, sobre todo cuando son perturbadas (Cicero Jurado *et al.*, 2017).

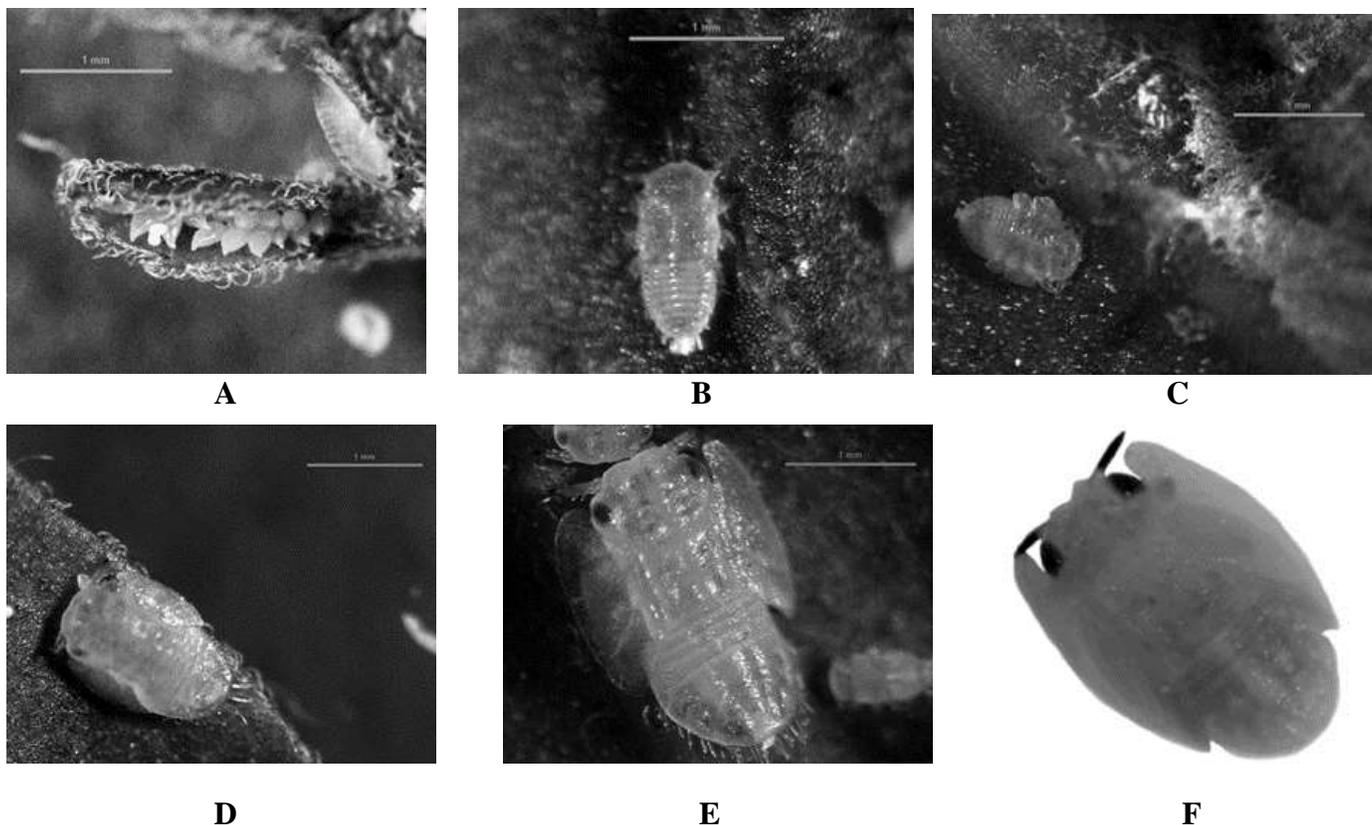


Figura 2. Estadios de desarrollo de *D. citri*. A) Huevos, B) Ninfas de 1er instar, C) Ninfa de 2d instar, D) Ninfa de 3er instar, E) Ninfa de 4to instar y F) Ninfa de 5to instar (Cicero Jurado *et al.*, 2017).

Las ninfas y adultos causan daño directo al extraer grandes cantidades de savia en las hojas y peciolo, con el consiguiente debilitamiento de las plantas (Takao Yamamoto, Rodriguez Alves, & Beloti, 2014). Por otro lado, el daño indirecto y de mayor relevancia se debe a su papel como vector del agente causal del HLB.

*D. citri*, se encuentra ampliamente distribuido y debido a su presencia en una variedad de áreas fuera de las plantaciones, como zonas residenciales (patios, traspatios), parques, escuelas y áreas comerciales con jardines rodeados con *Murraya paniculata* y otros críticos, así como huertos abandonados, se necesitan nuevas herramientas para mejorar su detección, seguimiento y manejo.

## **D. Manejo del vector.**

A nivel mundial, el manejo del vector *D. citri* ha sido uno de los tres componentes críticos del manejo de HLB, además de plantar material de vivero libre de patógenos y eliminar inóculo mediante la destrucción de árboles infectados. Debido a la dificultad para detectar infecciones tempranas de la bacteria en árboles y la rápida propagación del HLB, los programas de manejo se han concentrado en el manejo del vector, pero se han documentado disminuciones en la susceptibilidad del insecto a varios insecticidas lo que indica la necesidad de herramientas más sostenibles (Grafton Cardwell, Stelinski, & Stansly, 2013).

### **1. Manejo Cultural**

El manejo cultural también forma parte del manejo integrado del vector, dentro del cual su monitoreo es clave. El monitoreo poblacional de *D. citri*, es la forma de determinar si el vector está presente en diferentes lugares de la plantación y se considera una herramienta indispensable tanto para el manejo del vector y de la enfermedad (conociendo su nivel de incidencia y severidad) (Monzo *et al.*, 2015), así como criterio para tomar la decisión de realizar aplicaciones químicas u otros métodos que van a repercutir en los costos económicos y ambientales del manejo que se realiza.

Las técnicas de monitoreo empleadas son el monitoreo por golpeo de ramas o stem-tap, que permite detectar adultos en el follaje de cítricos sin necesidad de buscarlos; el monitoreo visual por medio de personal capacitado para reconocer sus diferentes estados biológicos y el monitoreo por medio de trampas pegajosas amarillas (Bouvet & Hochmaier, 2018), utilizado en diferentes países productores de cítricos y de gran importancia en sus programas de manejo agroecológico para el manejo de *D. citri*.

### **2. Control Biológico**

Otra alternativa empleada para el manejo de *D. citri* incluye la aplicación de estrategias de control biológico como parte de programas de manejo integrado del vector. El uso de diferentes enemigos naturales principalmente parasitoides como *Tamarixia radiata* (Eulophidae) y *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Encyrtidae); depredadores como *Olla-V*

*nigrum*, *Cycloneda sanguínea* y especies de la familia Crisopidae y hongos entomopatógenos como *Hirsutella citrifomis*, *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*); *Isaria javanica* (= *Paecilomyces javanicus*); *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*) y *Beauveria bassiana*; buscan conservar e incrementar las poblaciones de enemigos naturales y reducir la presión poblacional de *D. citri* (Grafton Cardwell *et al.*, 2013).

### **3. Manejo Químico.**

Para el manejo de *D. citri*, el manejo químico es la principal estrategia empleada, utilizando insecticidas de contacto y sistémicos durante las diferentes etapas del cultivo, siempre alternando diferentes grupos químicos para reducir el riesgo de aparición de poblaciones de vectores resistentes (Takao *et al.*, 2014). Los calendarios, quincenales o mensuales, aunque inducen la sensación de una eliminación casi completa del insecto, resultan tanto en aplicaciones innecesarias de insecticidas como en un inadecuado manejo, ya que en el intervalo entre fumigaciones pueden ocurrir brotes poblacionales del vector. Otro inconveniente de esta forma de manejo es la posibilidad, con bastante frecuencia, de la aparición de lluvias y / o nuevos brotes en las plantas, que provocan una reducción del período residual del insecticida utilizado (Belasque *et al.*, 2010).

#### **E. La ecología química y papel de los compuestos volátiles.**

Estudios recientes han demostrado que los estímulos emitidos por los brotes pueden jugar un papel importante en la detección de plantas hospederas para *D. citri*. En términos de señales visuales, *D. citri* se siente atraído de forma innata por el amarillo brillante y el verde, colores que pueden ser indicativo de brotación joven. Tomando en cuenta que *D. citri* se reproduce y desarrolla solamente en brotes emergentes de sus plantas rutáceas hospederas existen referencias de investigaciones que prueban la importancia de compuestos volátiles provenientes de plantas como naranja dulce, limones, ornamentales como la *M. paniculata* y otros en los que se prueba que tanto machos como hembras muestran atracción hacia los mismos (Patt & Sétamou, 2010).

Dicha atracción también es estimulada por señales olfativas emitidas por las plantas hospederas, como fue demostrado por Wenninger, Stelinski & Hall (2009), quienes utilizando un olfatómetro de tubo en Y, examinaron las respuestas de conducta de machos y hembras de *D. citri* a los olores de 4 especies cítricas con y sin señales visuales; determinando que *D. citri* utiliza señales olfativas y visuales en la orientación hacia las plantas hospederas lo cual sugiere la posibilidad del uso de compuestos volátiles vegetales en el monitoreo y manejo de esta plaga.

El comportamiento de búsqueda del huésped en *D. citri* es complejo y comprende varias modalidades sensoriales (Amorós *et al.*, 2019), particularmente *D. citri* se basa generalmente en el olfato y la visión para la detección de señales del hospedero (Mann *et al.*, 2011). La sensibilidad de este insecto a olores emitidos por brotes emergentes puede depender de un número de diferentes características de olor, como composición volátil, proporcionalidad o relación y concentración (Patt & Sétamou, 2010).

La importancia de los volátiles de las plantas radica en que pueden actuar como señales para otros organismos, y aún para la misma planta; además, pueden ser exportados y modificar el entorno de las especies que los producen, sus vecinos y sus enemigos. Los volátiles químicos sirven a las plantas para: reproducción, al atraer polinizadores o dispersores de semillas; como defensa para repeler insectos o detener la colonización de bacterias y hongos fitopatógenos; para atraer enemigos naturales de herbívoros; y como mensajeros intra e interespecíficos (Marín Loaiza & Céspedes, 2007).

La ecología química, se encarga de estudiar las interacciones bióticas mediadas por sustancias químicas involucradas en las interacciones ecológicas intra e interespecíficas de organismos vivos (Cortez, 2013). Dichas interacciones son variables entre especies, así como los efectos ocasionados, y muchas de ellas están asociadas con metabolitos constitutivos o inducidos como respuesta a un estímulo. Esos metabolitos, principalmente los secundarios, producen cambios morfológicos y conductuales en los organismos involucrados, ya sean plantas, animales o microorganismos (Marín Loaiza & Céspedes, 2007).

Los compuestos químicos utilizados en la comunicación son denominados semioquímicos y tradicionalmente han sido subdivididos en cuatro categorías: alomonas, sinomonas, kairomonas y feromonas (Marina, 2018). Las feromonas son compuestos químicos utilizados en la comunicación intraespecífica (entre mismas especies) mientras que los demás grupos, las alomonas, sinomonas y kairomonas son compuestos involucrados en la comunicación interespecífica y se clasifican según quien se vea beneficiado con el compuesto emitido. Las alomonas (emisor) son compuestos que presentan un beneficio al organismo que las produce con un costo al organismo que las percibe, mientras que las kairomonas (receptor) presentan un costo para el emisor y beneficio para el receptor. Por último, las sinomonas (ambos organismos) son aquellos compuestos que presentan beneficios tanto para el emisor como el receptor; funcionando estos compuestos como atrayentes o repelentes en diferentes especies. (Borrero, 2017).

Los compuestos volátiles o semi-volátiles liberados por las plantas son extraídos o capturados por el método de aireación dinámica o “Dynamic headspace”. Este sistema permite recolectar los compuestos liberados por la planta entera o por algunas estructuras, como yemas, brotes, flores o frutos y en conjunto con los métodos de cromatografía de gases y espectrometría de masas, permiten identificar cuantitativa y cualitativamente compuestos de interés, de tal forma que puedan estar disponibles para utilizarlos como repelentes o atrayentes de algún insecto meta (Velázquez González, Cibrián Tovar, Hidalgo Moreno, & Vásquez Rojas, 2011).

Es importante destacar que el uso de compuestos atrayentes o repelentes puede ser implementado dentro de planes de Manejo Agroecológico de Plagas (MAP) como alternativas basadas en principios ecológicos, tomando en cuenta que el MAP es un sistema de apoyo para toma de decisiones en la selección y aplicación de tácticas de manejo de plagas, ya sea de manera individual o armoniosamente combinadas en una estrategia de manejo (Nieves, 2019).

Algunas publicaciones que permiten comprender el avance y relevancia de la ecología química y el papel que juegan dentro del manejo de plagas se destacan por ejemplo el estudio

de Amorós *et al.*, (2019), en el cual se investigaron las respuestas de *D. citri* a los volátiles característicos de hospederos cítricos para mejorar las trampas de monitoreo; coleccionando volátiles de dos especies de cítricos pomelo Duncan y naranja dulce en cámaras de aireación analizadas por cromatografía de gases y espectrometría de masas, comparando la respuesta a los señuelos con diferentes combinaciones y dosis de volátiles desplegados en trampas adhesivas amarillas; obtuvieron como resultado el incremento en las capturas de *D. citri*.

Coutinho Abreu *et al.*, (2014), identificaron los olores que funcionan como activadores, inhibidores, y activadores prolongados de las neuronas receptoras de olor (NRO) de *D. citri*, que pueden ser útiles para su atracción. También identificaron olores que pueden ser útiles para reducir la atracción hacia los hospederos. En pruebas de campo, probaron olores activantes identificados electrofisiológicamente e identificaron una mezcla de 3 olores que mejoran la captura de trampas.

Fancelli *et al.*, (2018), recolectaron volátiles de *M. paniculata* y *C. sinensis*, *Psidium guajava*, *Mangifera indica*, *Anacardium occidentale* de *D. citri*. Compararon por medio de un olfatómetro el comportamiento de machos y hembras hacia los volátiles de dichas plantas, determinando que las hembras pasaron más tiempo en los brazos que contenían volátiles de *M. paniculata* o *C. sinensis* en comparación con los brazos del control. Así mismo los análisis químicos revelaron la presencia de dos terpenoides, cuyos resultados sugirieron que a mayor liberación de terpenoides por *A. occidentale*, la hizo poco atractiva para *D. citri*, concluyendo que dichos terpenoides podrían ser utilizados para reducir la colonización de plantas de cítricos y, por lo tanto, la infección por HLB.

Mann *et al.*, (2011), examinaron el efecto de volátiles del ajo (*Allium tuberosum*) y de la cebolla silvestre (*Allium canadense*) sobre el comportamiento de *D. citri* en un olfatómetro. El análisis reveló que los monosulfuros, disulfuros y trisulfuros fueron los principales compuestos volátiles de azufre presentes. En general, los trisulfuros inhibieron la respuesta de *D. citri* a cítricos volátiles más que disulfuros. Los monosulfuros no afectaron el comportamiento de los adultos de *D. citri*. Los volátiles de la planta *Allium spp.* no afectaron el comportamiento del ectoparasitoide de *D. citri*, *Tamarixia radiata* (Waterston)

y, por tanto, *Allium spp.* o los tri y disulfuros podrían integrarse en los programas de manejo de *D. citri* sin afectar enemigos naturales.

Por su parte, Onagbola *et al.*, (2010), informaron que la guayaba, *Psidium guajava*, reduce las poblaciones de *D. citri* e incidencia de HLB. Con los resultados que obtuvieron, verificaron que los volátiles de la hoja de guayaba inhiben la respuesta de *D. citri* a los volátiles de la planta huésped de cítricos. Además, demostraron que la implementación de campo de disulfuro de dimetilo sintético (DMDS) reduce densidades de *D. citri* y, por tanto, puede tener potencial como una nueva estrategia de manejo.

Patt & Sétamou (2010), examinaron la atracción de *D. citri* por olores de las plantas hospederas cítricas y una mezcla de terpenos sintéticos. Demostraron que tanto machos y hembras mostraron preferencia por olores de los brotes jóvenes de *M. paniculata* y *C. limon*. Solamente los machos mostraron preferencia olor de *C. sinensis*. Los volátiles emitidos por los brotes jóvenes del cultivar de toronja, *C. limon* y *M. paniculata* fueron analizados por cromatografía de gases y espectrometría de masas. Cuantitativamente los constituyentes dominantes fueron (E)- $\beta$ -ocimeno, linalol, acetato de linalilo y  $\beta$ -cariofileno y los utilizaron en prueba de no elección, los resultados indicaron que la mayoría de los individuos quedaron atrapados en los objetivos impregnados con la mezcla significativamente más, que en objetivos sin la mezcla. Estos resultados indican la viabilidad de desarrollar atrayentes de *D. citri* modelados sobre los volátiles reales de la planta huésped.

Es importante mencionar la existencia de una feromona para atracción de *D. citri*. Zanardi *et al.*, (2018), habían identificado el ácido acético como una feromona sexual y midieron las respuestas electro antenográficas del ácido fórmico y ácido propanóico; posteriormente el mismo grupo Zanardi *et al.*, (2019), examinaron en ensayos de comportamiento en laboratorio y pruebas de campo la viabilidad de estos tres semioquímicos, ácido acético, ácido fórmico y ácido propanóico como señuelos potenciales para atrapar *D. citri*; los cuales en dosis apropiadas son atrayentes específicos de machos y buenos señuelos para las trampas de *D. citri*, pero no actúan de forma sinérgica.

Un señuelo desarrollado recientemente con formulación mejorada tuvo el mismo rendimiento, durando más de un día, lo que condujo a una mejora importante en la captura de *D. citri*. a bajas densidades de población.

El descubrimiento de atrayentes químicos volátiles para *D. citri* puede permitir el desarrollo de nuevas estrategias de seguimiento y gestión que podrían reducir costos de producción, ayudar a optimizar los intervalos de pulverización, y / o reducir el uso de insecticidas.

## IX. METODOLOGÍA

El proyecto constó de dos fases. En la primera fase se determinó el análisis cualitativo de los compuestos volátiles extraídos de brotes jóvenes de dos rutáceas, *Murraya paniculata* y *Citrus sinensis* y en la segunda fase se evaluaron los compuestos seleccionados en campo adheridos a trampas pegajosas amarillas.

### A. Ubicación del estudio.

La fase uno del proyecto, se realizó en el invernadero del Programa de Control Biológico de la compañía Inversiones Guanaraja del Grupo Del Oro, ubicada en Finca Yafa, de La Cruz, Guanacaste, con el fin de utilizar la cría de *D. citri* que mantenían para investigación. Esta finca está ubicada en Latitud 11° 2'19.65"N, Longitud 85°30'24.52"O; la temperatura anual promedio es de 25°C, la humedad relativa promedio de 89% y el acumulado anual histórico de precipitación es de 2 372 mm.

Los análisis cualitativos de las muestras capturadas de brotes de las rutáceas se realizaron en los laboratorios de la empresa ChemTica Internacional, ubicado en Santo Domingo de Heredia. La fase 2 o de campo, se ubicó en primera instancia en el lote 21, de la Finca Yafa y posteriormente, por asunto de manejo se trasladó al lote Herradura de la finca Oros de la compañía Del Oro en La Cruz, Guanacaste, de acuerdo con lo expresado por el jefe de Investigaciones de la compañía Del Oro.

### B. Procedencia de plantas y pie de cría de *D. citri*.

Las plantas para utilizar de *M. paniculata* y *C. sinensis* y los adultos de *D. citri* se obtuvieron del vivero y del pie de cría respectivamente, que mantenía el programa de investigación del Departamento de Agronomía de la compañía Del Oro. Esta compañía facilitó algunos insumos necesarios para el mantenimiento básico de las plantas; labores de poda, fertilización y manejo de plagas y la manipulación de adultos del vector fueron responsabilidad del tesario.

### **C. Fase 1 (Invernadero y laboratorio). Determinación de los compuestos volátiles liberados por plantas atacadas por *D. citri*.**

Esta fase comprendió la extracción de los compuestos volátiles de brotes de plantas de *M. paniculata* y *C. sinensis*, con y sin la presencia de adultos y ninfas de *D. citri*. Las muestras de volátiles capturados fueron enviadas al laboratorio de ChemTica para la determinación y análisis cualitativo de los compuestos.

#### **1. Procedimiento.**

##### **a. Preparación de plantas de *M. paniculata* y *C. sinensis*.**

- Todas las plantas estuvieron sanas y sin ningún tipo de daño mecánico, enfermedad o plagas.
- Se seleccionaron 18 plantas de *M. paniculata* de aproximadamente 25 cm de altura y máximo 2 cm de grosor en su base radicular y 18 plantas de *C. sinensis* de aproximadamente 40 cm de altura y máximo 3 cm de grosor en su base radicular.
- Todas las plantas se ubicaron en jaulas de 80 cm de alto x 150 cm de ancho x 85 cm de fondo, con estructura de aluminio, piso de zinc liso, forradas en malla antiáfidos y puertas selladas con velcro de 1.5 pulgadas de ancho.
- A las plantas se les podó con anticipación cada vez requerido; además de fertilizar y llevar el riego habitual del invernadero para estimular brotación.

##### **b. Pie de cría de *D. citri*.**

- A este pie de cría se le dio el mantenimiento requerido y del mismo se tomaron los adultos necesarios para inocular en las plantas de *M. paniculata* o de *C. sinensis*, con al menos 2 semanas de anticipación.

##### **c. Extracción, análisis y selección de volátiles.**

- Para la extracción de volátiles se utilizaron recipientes de vidrio limpios tipo pecera (hechos a la medida).

- La pecera para naranja tiene 60 cm de alto x 20 cm de ancho x 20 cm de fondo, de vidrio incoloro y 4 cm de grosor + tapa de vidrio de 4 mm de grosor con dos orificios.
- La pecera para Murraya tiene 30 cm de alto x 25 cm de ancho x 25 cm de fondo, de vidrio incoloro y 4 cm de grosor + tapa de vidrio de 4 mm de grosor con dos orificios.
- La tapa de estos recipientes ha sido modificada de tal manera que un extremo posea una entrada de aire y el extremo opuesto tenga por su parte una salida del aire. En el lado de la entrada de aire se colocó un filtro de carbón activado (para purificar el aire) mientras que en el extremo opuesto se colocó un “filtro” que contiene el polímero poroso adsorbente denominado comercialmente Porapak® el cual a la vez se conectó a una bomba de aire que fuerza el paso del aire a través del sistema (Figura 3) y permitió capturar los compuestos volátiles presentes en la planta con o sin el vector.

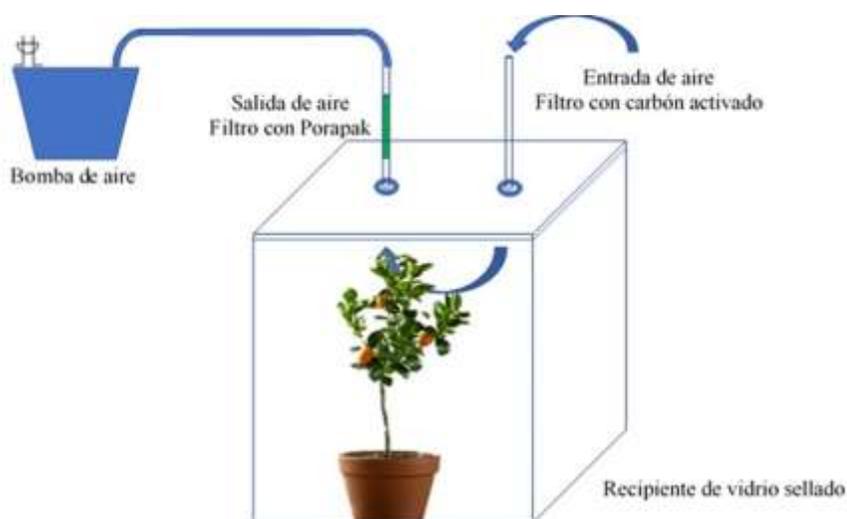


Figura 3. Equipo para colección de volátiles.

- Para todas las muestras, antes de la extracción de volátiles, se lavó bien el recipiente de vidrio (pecera) con jabón lavaplatos, luego se secó bien con un paño limpio y aire caliente, luego se limpió bien con etanol.
- Cada planta para utilizar se le sacó de su maceta, se le quitó el sustrato que se colocó aparte en un balde. El sistema radical se envolvió muy bien con papel aluminio, esto con el objetivo de evitar coleccionar volátiles del suelo u otros que no tuvieran nada que ver con el insecto plaga.

- Se colocó la planta en el recipiente de vidrio, se selló bien la tapa con Parafilm y masking tape y en los orificios de la tapa se colocaron los filtros, conectando de una vez la bomba de aire a la toma de electricidad.
- Se colocó una etiqueta en una esquina del recipiente con la fecha, el código de la muestra que incluyó, número de muestra, tratamiento, repetición y especie de la planta, así como la hora inicial y hora final de la muestra.
- El tiempo de extracción fue de 24 horas para todas las muestras.
- Cumplidas las 24 horas, se desconectó la bomba, se retiraron los filtros de la tapa y se guardaron en lugar fresco.
- El filtro con los volátiles extraídos fue etiquetado con la información respectiva (código de muestra, fecha de extracción, hora inicial y final de extracción), se guardaron en frío (refrigerador) y fueron enviados lo más pronto posible al laboratorio de ChemTica Internacional para su análisis respectivo.
- La separación y detección de compuestos volátiles orgánicos se realizaron mediante los métodos estándar de cromatografía de gases (CG) y espectrometría de masas (EM).
- Los filtros enviados a los laboratorios de Chemtica fueron extraídos con hexano y posteriormente inyectados en un cromatógrafo de gases con un programa que consistió en una temperatura inicial de 80 °C por dos minutos con aumentos de 25 °C por minuto, hasta una temperatura final de 300 °C por cinco minutos. Los cromatogramas obtenidos con el detector de espectrometría de masas fueron comparados en la base de datos del *National Institute of Standards and Technology (NIST Chemistry Webbook)*, para encontrar coincidencia de los espectros moleculares de dichos compuestos con los de compuestos ya reportados en el NIST.
- Los resultados permitieron saber qué compuestos volátiles están relacionados o pueden ser inducidos por la presencia de la plaga y que pudieran intervenir en la atracción del insecto.
  1. Luego de obtener los resultados se analizó la significancia del total de compuestos de acuerdo con los siguientes puntos; a) aquellos compuestos que aparecieron solamente una vez en todas las muestras fueron descartados por inconsistencia;

b) se buscó y se puso atención a los compuestos que estaban o no en plantas de *Murraya* como de Naranja con y sin *D. citri*; c) aquellos compuestos que aparecieron en todos los tratamientos fueron seleccionados por su potencial significancia; y finalmente, d) basados en la literatura para determinar cuáles de todos los compuestos podrían tener o no importancia se seleccionaron los compuestos p-cimeno y ácido propanoico, 2-(3-acetoxi-4,4,14-trimethylandrosta-8-en-17-yl) para ser utilizados en las pruebas de campo.

#### **D. Variables.**

La variable por determinar en esta fase fueron los tipos y la frecuencia de compuestos volátiles presentes en las plantas con y sin presencia del vector.

#### **E. Análisis estadístico.**

Para el análisis estadístico se realizó una distribución de frecuencias para los compuestos obtenidos en las muestras de cada planta en función de la presencia o no del vector, brindando la tabla con su respectivo gráfico. En aquellos compuestos que coincidan en las repeticiones, se determinaron las medidas de posición y de variabilidad más importantes.

#### **F. Fase 2 (Campo). Evaluación en campo de los compuestos atrayentes seleccionados.**

El objetivo de esta fase consistió en comparar los compuestos candidatos determinados en la aireación dinámica con los de la literatura y preparar dispensadores que incluyeron los compuestos seleccionados para ser evaluados como atrayentes.

##### **1. Procedimiento.**

- Se seleccionó un lote homogéneo (edad, variedad comercial) con incidencia de *D. citri*.

- Se utilizaron trampas amarillas pegajosas con goma “stickem special”, de 25 cm de largo x 15 cm de ancho. Las trampas amarillas se adhirieron a un marco y regla de madera de 1 x 3 pulgada x 3 metros de largo que fueron colocadas en el tercio superior del árbol (Figura 4).



Figura 4. Modelo de colocación de trampas amarillas utilizadas para el monitoreo de *D. citri* en cítricos.

- Las trampas se colocaron en dirección a la predominancia general del viento.
- Los volátiles de interés fueron empacados en membranas poliméricas de 1 x 1 pulgadas, y colocados junto a la trampa amarilla específica de acuerdo con el tratamiento respectivo. Las trampas amarillas solas fueron utilizadas como tratamiento testigo.
- El diseño del ensayo fue con 5 bloques completos al azar y 3 tratamientos que permitieron comparar los compuestos de interés más 1 tratamiento testigo. Los tratamientos se definieron con los compuestos analizados y seleccionados de la fase 1.
- Los tratamientos establecidos se describen en el cuadro 1.:

**Cuadro 1.** Tratamientos establecidos para la prueba de campo.

N de Tratamiento	Composición	Objetivo biológico
T1	Mezcla de ácidos grasos volátiles	Feromona
T2	Mezcla 1:1:1 de p-cymeno, myrceno y butirato de etilo	Kairomona
T3	Combinación de T1 y T2	Feromona + Kairomona
T4	Trampas amarillas solas	Atrayente

- Las trampas fueron colocadas cada 10 metros y los bloques cada 2 calles (12 metros).
- Los muestreos se realizaron semanalmente por un total de 12 semanas, recolectando las trampas y contabilizando el total de adultos capturados por trampa, de acuerdo con los tratamientos.
- Los datos se registraron y almacenaron para su análisis respectivo.

## 2. Variables.

La variable fue la cantidad de adultos de *D. citri* capturado por tratamiento. Para lo cual se recolectaron todas las trampas debidamente identificadas y en la oficina a disposición se contaron los adultos de cada trampa con ayuda de una lupa.

## 3. Análisis estadístico.

Se analizó mediante comparación de medias a través de métodos paramétricos en caso de que siga una distribución normal o métodos no paramétricos en caso de no seguir una distribución normal.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + \delta_{ij} + \beta_k + \varepsilon_{ijk}$$

$$\text{con: } i = 1 \dots p, \quad j = 1 \dots 5, \quad k = 1 \dots 5$$

Con

$Y_{ijk}$ : variable de respuesta del i-ésimo tratamiento, j-ésimo semana de evaluación y la k-ésima bloque.

- $\mu$ : media general
- $\alpha_i$ : efecto de la i-ésimo tratamiento.
- $\gamma_j$ : efecto de la j-ésimo tiempo de evaluación.
- $\delta_{ij}$ : efecto adicional (interacción) para la combinación de los niveles i del tratamiento y j semana de evaluación.
- $\beta_k$ : efecto del k-ésimo bloque.
- $\varepsilon_{ijk}$ : término de error que se distribuye normal independiente con media cero y varianza constante.

Se comprobaron los supuestos del ANOVA con gráficos diagnósticos (cuantiles de los términos de error, gráficos de residuos y gráficos de residuos vs. predichos) y se seleccionó el mejor modelo en función de los criterios de Akaike (AIC) y de información Bayesiano (BIC). En las variables donde existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos, se realizaron las comparaciones de medias por medio de la prueba de Prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) ( $p \leq 0.05$ ) permitiendo la formación de grupos excluyentes y no transición entre tratamientos.

## X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. Composición química de extracción de compuestos orgánicos volátiles en *Citrus sinensis* y *Murraya paniculata* en plantas con y sin inoculación de poblaciones de *D. citri*.

Un total de 40 compuestos volátiles, constituyeron la colección reconocida a partir de cromatografía de gases y espectrometría de masas en muestras de naranja dulce (*Citrus sinensis*) y murraya (*Murraya paniculata*) con y sin adultos del psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Identidad y frecuencia de aparición de compuestos orgánicos volátiles detectados en las muestras analizadas de Naranja y Murraya con y sin interacción de colonias de *D. citri*.**

	Naranja sin <i>D. citri</i>	Naranja con <i>D. citri</i>	Murraya Sin <i>D. citri</i>	Murraya con <i>D. citri</i>
Compuesto	Frecuencia	Frecuencia	Frecuencia	Frecuencia
(+)-delta-cadineno	++++	-	+	-
1-octen.3.yl-acetato	-	+	-	-
2-heptanona	++++	-	-	-
3-careno	++++	++	-	-
3-heptanona	-	-	+	-
4-careno	++	+	-	-
4-etil-acetofenona	++	+	+++	++
Acet. de 4-hexen-1-ol	++	-	-	-
8-cedren-13-ol	++	-	++	-
a-copaeno	++	++	+	-
a-cubebena	+	-	+	-
a-felandreno	+	-	-	-
a-pineno	+	+	+	+
b-cubebena	+	-	-	-
B-gurjuneno	+	-	+	-
a-felandreno	-	++	-	-
b-pineno	+	+++	-	-
camfeno	+	-	-	-
carveol	-	-	+	-
cariofileno	+	-	-	-
hidrato de cis-sesquisabineno	+	-	+	-
copaeno	+	-	-	-
cupedol	+	-	++	+
cupenol	-	-	+	-
cumeno	-	-	+	-
D-limoneno	++++	++	+	+
Acetato de e-2-hexenol	-	+	-	-
gamma seleno	+	-	-	-
éster butílico del ácido hexanoico	-	-	-	+
benzaldehído isopropílico	-	-	+	-
octen.3.ol acetato	-	-	-	+
p-cymen-7-ol	+	-	+	++
p-cimeno	+	+	++	-
p-etilbenzaldehído	+	-	+	-
ácido propanoico	-	+	-	+++
psi-cumeno	-	-	-	+
Acetato de R-linalilo	-	-	-	+
timol	+	-	-	-
hidrato de trans-sesquisabineno	+	-	-	-
xileno	+	++	++	+++

Frecuencia “+”: cantidad de veces que fue percibido un compuesto en la totalidad de lecturas realizadas. Los compuestos específicos se identifican tentativamente a partir de la comparación de sus espectros de masas con reseñas de bases de datos disponibles; así como la comparación con índices de retención y espectros de masas de patrones sintéticos inyectados en las mismas condiciones.

Cada compuesto fue detectado a diferentes frecuencias durante los muestreos realizados. Del total de compuestos registrados, la mayor proporción representada por un 48% del total se encontraron con una frecuencia igual a uno; 17 compuestos se encontraron con una frecuencia entre dos y cinco simbolizando un 43% del total. Finalmente, cuatro compuestos presentaron una frecuencia mayor a cinco figurando un 10% del total de compuestos encontrados.

Se presentan en las figuras 5, 6, 7 y 8 cuatro de los cromatogramas obtenidos para ejemplificar algunos de los compuestos volátiles capturados durante los muestreos para naranja y murraya con y sin *D. citri*.

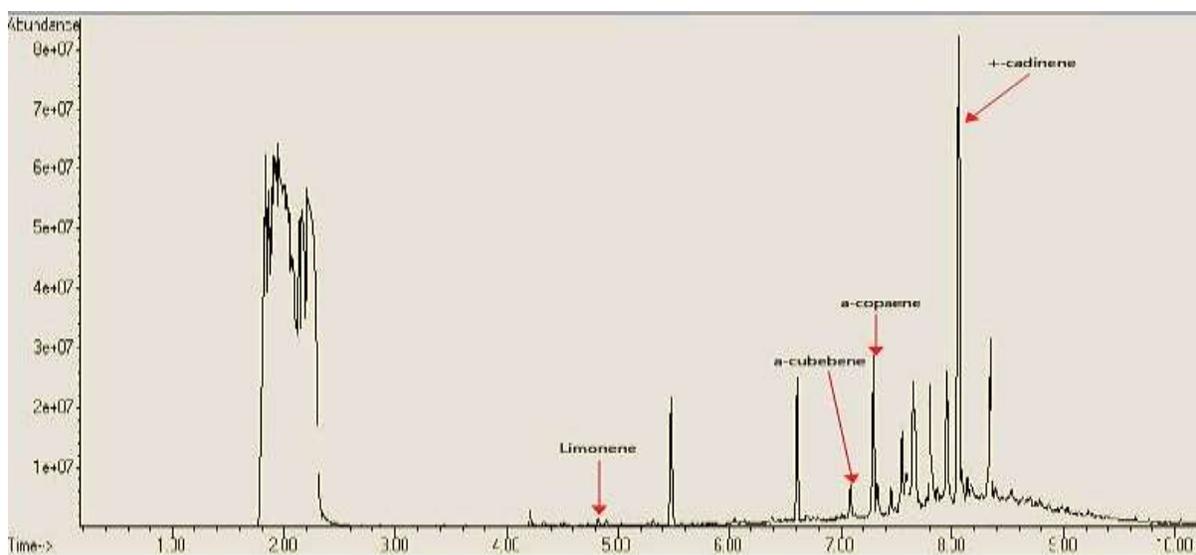


Figura 5. Cromatograma de captura de volátiles de una de las muestras para naranja sin *D. citri*

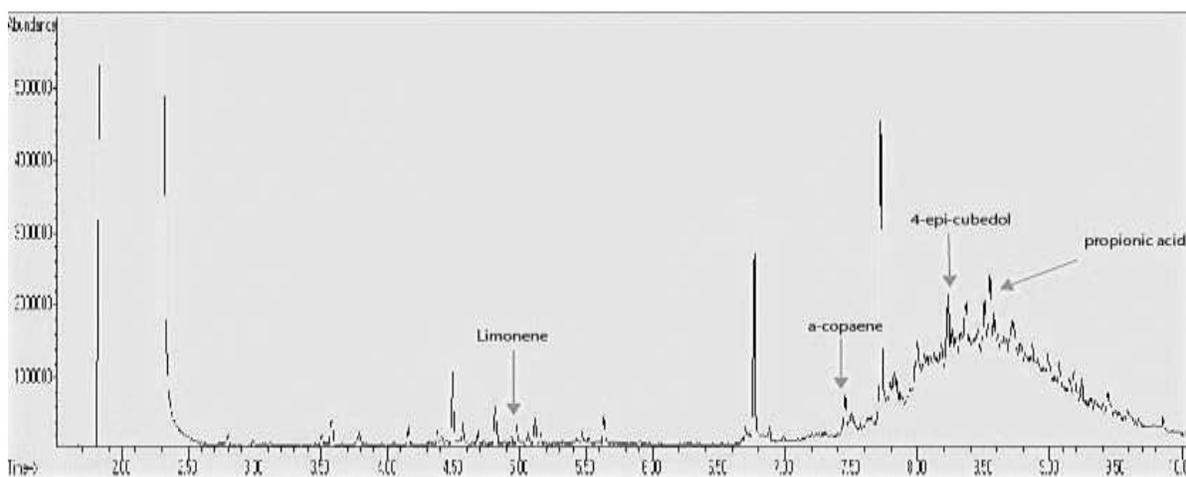


Figura 6. Cromatograma de captura de volátiles de una de las muestras para naranja con *D. citri*

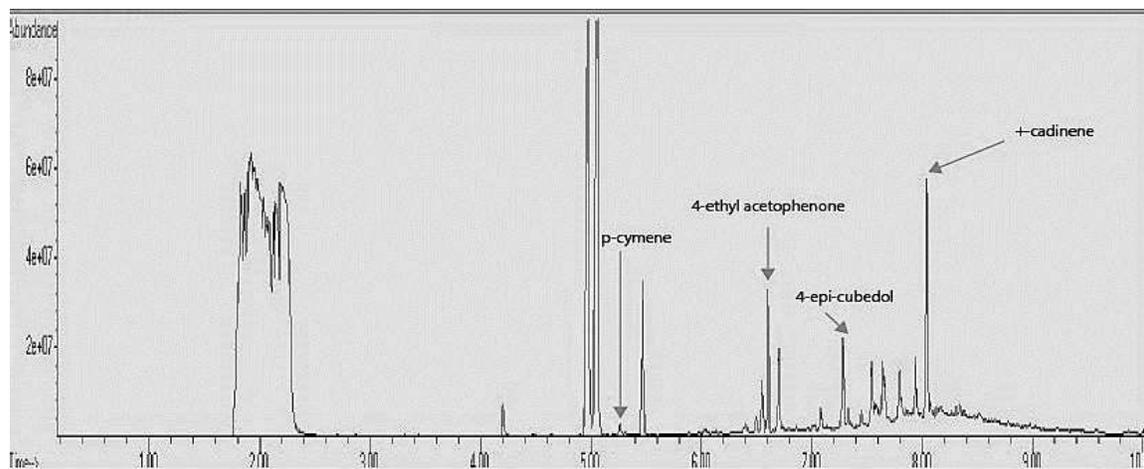


Figura 7. Cromatograma de captura de volátiles de una de las muestras para *Murraya* sin *D. citri*

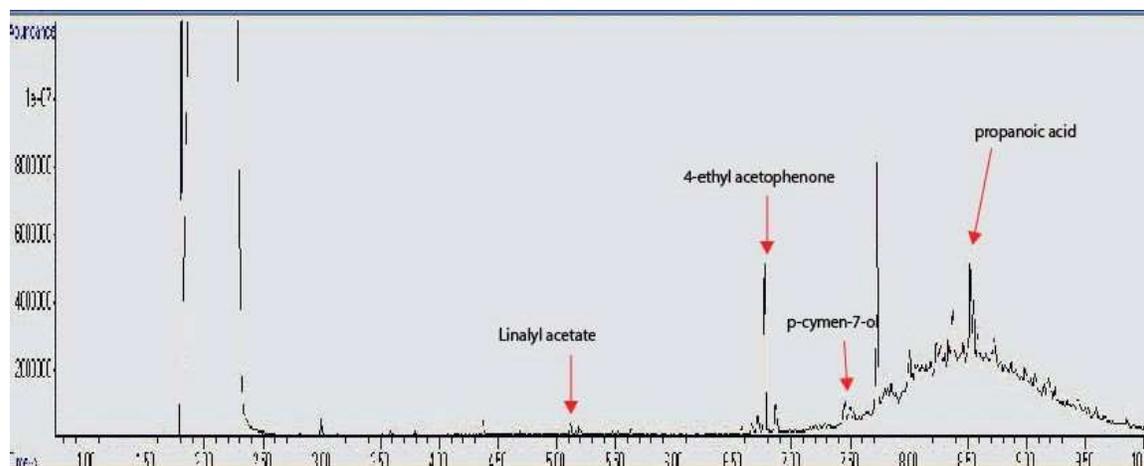


Figura 8. Cromatograma de captura de volátiles de una de las muestras para *Murraya* con *D. citri*

La frecuencia de aparición permitió discriminar cuales compuestos fueron detectados en mayor cantidad de veces durante los muestreos realizados, sin embargo, la mayor frecuencia no significó tener a disposición uno o varios compuestos con potencial atrayente del psílido, tal y como se logra encontrar en la literatura, la cual permitió ir descartando y seleccionando compuestos con potencial.

Los compuestos que fueron encontrados en mayor cantidad de veces fueron; 4-etil-acetofenona, el D-limoneno, xileno y 3-careno todos con una frecuencia mayor a cinco. De acuerdo con Collins, Bryning, Wakefield, Chambers, & Cox (2007), el compuesto 4-etil-acetofenona en conjunto con otros compuestos provocó incrementos positivos en las respuestas de conducta de tres especies de escarabajos de mayor importancia como plagas de

granos en el Reino Unido y su identificación pudo haber sido la base para la formulación de un señuelo de los insectos mencionados.

Por su parte Rodríguez (2013) indica que, en los frutos cítricos, los monoterpenos son los principales componentes de las glándulas del aceite esencial de la cáscara (flavedo), siendo el D-limoneno el más abundante (hasta 95% en la naranja), y que el alto contenido de este compuesto volátil puede ser una señal para la atracción de plagas como *D. citri*.

Dicha posición es reforzada por Mann, *et al.*, (2012), quienes resaltan la atracción de *D. citri* por volátiles comunes liberados por los cítricos como D-limoneno, implicándolo como señal de selección general del huésped. Además, indican que el D-limoneno es un volátil predominante de cítricos liberados por las brotaciones, follaje y frutos. Ambos aportes, aseveran que la presencia de dicho compuesto, favorecen efectivamente la atracción del psílido hacia las plantas utilizadas en las evaluaciones, lo cual valoramos en los resultados obtenidos en nuestros muestreos, ya que a pesar de estar presente en ambas plantas con y sin psílicos, la mayor frecuencia de aparición ocurrió en naranja sin *D. citri*.

Peris (2020), hace referencia a las correlaciones existentes entre el D-limoneno y la atracción de insectos de diferentes especies de insectos, sobre todo enfatizando en moscas de la fruta, lo que nos hace entender de la fuerte atracción que juega dicho compuesto como atrayente de ciertas especies de insectos y especialmente su potencial para servir como señuelo de *D. citri*. No obstante, dado que la idea de la tesis era evaluar compuestos no constitutivos de los cítricos si no aquellos que pudieran ser inducidos por la presencia del vector, D-limoneno no fue considerado para las pruebas subsiguientes.

Tomando en cuenta lo mencionado, se continuó con la selección de compuestos con potencial atrayente para *D. citri*. En este punto, 21 compuestos que aparecieron solamente una vez fueron descartados por inconsistencia después de los muestreos realizados.

En el cuadro tres, se observan 18 de los compuestos presentes en la colección total, cuyos valores de % de similaridad, permitieron un acercamiento a la identidad probable de los

compuestos de la identidad de los compuestos encontrados en los muestreos y que pudieron favorecer la selección de acuerdo con su potencial comparados con la literatura. En este punto, toma mayor importancia el porcentaje de similaridad, así como la frecuencia de aparición de los compuestos.

Loaiza y Céspedes 2007, explican que, en la cromatografía de gases, el tiempo de retención se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de su respuesta máxima y que, la comparación del espectro de masas de cada componente de la mezcla con los que se tienen en bases de datos (referencias), permite la identificación del compuesto.

Para la identificación y selección de los compuestos tomando en cuenta el tiempo de retención, se debe tener claro que, a partir de los diferentes muestreos para un mismo compuesto, el tiempo de retención sea similar y no varíe mucho entre una y otra lectura. Una diferencia pronunciada en los tiempos de retención entre una muestra y otra significa menor probabilidad de la identidad de un compuesto específico (F. González, comunicación personal, 17 de agosto, 2021). Para representar lo anterior, en el cuadro 4, se visualiza la media de los tiempos de retención y la desviación estándar respectiva para cinco casos seleccionados (con frecuencia igual o mayor a tres), lo que nos revela que la escasa diferencia entre dichos tiempos permiten corroborar su identidad. Con respecto al porcentaje de similaridad, fue utilizado como parámetro adicional para la identificación de los compuestos, F. González (comunicación personal, 17 de agosto, 2021).

En los cuadros tres y cuatro, se rescatan varios puntos importantes relacionados con la colección de volátiles que permiten acercar explicaciones de las interacciones entre las plantas utilizadas y la ausencia o presencia del psílido durante los muestreos. Se observa la detección e identificación de un total de 18 compuestos, de los cuales 17 se reportaron para naranja y 14 para murraya sin la presencia del psílido, además de 10 compuestos para naranja y 7 para murraya con la presencia del psílido.

Es evidente que en nuestro proyecto la presencia del psílido limitó o inhibió el perfil de volátiles capturados tanto para naranja como para murraya, lo cual no coincide al comparar

con otras investigaciones de orientación similar como en el caso de Hijaz, El-Shesheny, Killiny, 2013, quienes señalan que el hábito alimenticio de *D. citri* (chupador), indujo grandes cambios en el perfil de volátiles de las plantas de naranja Valencia evaluadas; esto podría deberse al tiempo de exposición de las plantas a los adultos de *D. citri*, que en el caso de Hijaz, estuvieron expuestos durante cinco meses y en nuestro caso, el tiempo de exposición máximo de las plantas con el psílido fue de un mes al momento de tomar las muestras.

Ahora bien, son variadas las interacciones que surgen a partir de la alimentación por parte de insectos herbívoros. Los volátiles liberados de plantas dañadas por herbívoros pueden resultar en una defensa directa o indirecta en su contra entre otras (Hijaz, El-Shesheny, & Killiny, 2013), esto sugiere que las respuestas con respecto al perfil de volátiles capturados en un momento dado pueden ser cualitativa y cuantitativamente diferentes.

**Cuadro 3. Valores medios de los tiempos de retención y % de similaridad de los compuestos volátiles en muestras de naranja y murraya con o sin *D. citri*.**

Compuesto	Naranja sin <i>D. citri</i>		Naranja con <i>D. citri</i>		Murraya Sin <i>D. citri</i>		Murraya con <i>D. citri</i>	
	Tiempo de Retención	% de Similaridad						
	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media
(+) - delta-cadineno	6,95	26,60	-	-	8,04	34,4	-	-
3-careno	4,93	9,14	4,48	10,8	-	-	-	-
4-careno	8,13	30,25	4,15	5,00	-	-	-	-
4-etil-acetofenona	7,36	19,35	6,68	33,4	6,70	38,8	6,79	32,9
8-cedren-13-ol	6,57	12,58	-	-	7,89	13,15	-	-
a-copaeno	4,05	17,50	7,45	11,23	7,45	14,2	-	-
a-cubebeno	4,13	25,50	-	-	7,10	11,50	-	-
a-pineno	4,59	7,13	4,30	11,30	4,58	9,32	4,30	4,02
B-gurjuneno	4,60	6,70	-	-	7,80	7,69	-	-
b-pineno	7,10	12,60	4,58	13,6	-	-	-	-
hidrato de cis-sesquisabineno	4,99	4,35	-	-	7,44	18,2	-	-
cubedol	7,20	44,00	-	-	7,32	7,85	7,40	7,57
D-limoneno	4,93	9,14	4,96	6,09	4,96	3,62	5,02	2,35
p-cymen-7-ol	7,20	44,00	-	-	6,40	9,55	6,63	11,02
p-cymeno	7,84	7,86	6,54	10,50	5,56	7,57	-	-
p-etilbenzaldehído	6,55	9,67	-	-	6,03	17,00	-	-
ácido propanoico	-	-	8,56	11,90	-	-	8,55	9,56
xileno	7,90	7,89	3,54	26,00	4,31	44,10	3,63	21,17

El tiempo de retención y % de similaridad están basados y comparados con la base de datos del NIST (*National Institute of Standards and Technology*).

**Cuadro 4. Valores medios y desviación estándar de los tiempos de retención de cinco compuestos volátiles seleccionados en muestras de naranja y murraya con o sin *D. citri*.**

Compuesto	Naranja sin <i>D. citri</i>		Naranja con <i>D. citri</i>		Murraya Sin <i>D. citri</i>		Murraya con <i>D. citri</i>	
	Tiempo de Retención		Tiempo de Retención		Tiempo de Retención		Tiempo de Retención	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
4-etil-acetofenona	7,36	0,34	6,68	-	6,70	0,15	6,79	0,10
a-pineno	4,59	0,34	4,30	-	4,58	-	4,30	-
D-limoneno	4,93	0,38	4,96	0,09	4,96	-	5,02	-
ácido propanoico	-	-	8,56	-	-	-	8,55	0,01
xileno	7,90	0,69	3,54	0,06	4,31	0,36	3,63	0,15

DE: Desviación estándar para los compuestos con más de dos apariciones en los muestreos.

Los resultados indican que 5 compuestos no fueron capturados en plantas con presencia de *D. citri*, es decir que, la interacción con el psílido de alguna manera podría inhibir la emisión de estos compuestos, entre los que se mencionan, el delta cadineno, el 8-cedren-13-ol, el cubebeno, el gurgujeno, y el p-etil benzaldehído.

De acuerdo con Murugesan, Rajeshkannan, Suresh Babu, Sumathi, & Manivachakam (2012), en su estudio confirman que el delta cadineno y el cubebeno forman parte del perfil volátil del aceite esencial de *Lantana camara*, presentando acción insecticida contra el defoliador de la teca (*Tectona grandis*); Abdelsalam, N, *et al.*, (2019), referencian al 8-cedren-13-ol, con propiedades toxicológicas al estudiar el potencial insecticida de coníferas en Egipto. García, M. *et al.*, (2007), señala al  $\beta$ -gurjuneno, como parte del complejo químico del aceite esencial de la panta *Flourensia oolepis* y sus propiedades repelentes e insecticidas en contra del coleoptero *Tribolium castaneum*; finalmente, Castellanos (2019), en su tesis de grado, refiere al potencial del benzaldehído para atraer enemigos naturales de plagas al ser emanado por plantas dañadas por insectos.

De esta manera, se entiende que estos compuestos presentan un factor en común, tienen propiedades toxicológicas insecticidas y atrayentes para enemigos naturales, lo cual sugiere la hipótesis que el insecto podría, a través de sus hábitos alimenticios y alta incidencia de adultos y ninfas inhibir por algún mecanismo de supresión, la expresión genética de la planta que permite emitir dichos volátiles que pueden afectar directamente su actividad biológica.

Se encuentran en la literatura, artículos relacionados con los 18 compuestos representados en el cuadro 3 para los cuales, en su mayoría, las referencias no indican efectos atractivos o repelentes con respecto a *Diaphorina citri*, o inclusive relacionadas a cítricos en específico los de nuestro interés como *Citrus sinensis* o *Murraya paniculata*, por lo tanto, son separados del objetivo de estudio.

Tomando en consideración lo mencionado en la información anterior, nos concentramos en los dos compuestos de mayor importancia de acuerdo con referencias relacionadas; el p-cimeno y el ácido propanoico resaltados en rojo en el cuadro 5. Las referencias encontradas con respecto a estos dos compuestos indican su potencial como atractivos de *D. citri*.

**Cuadro 5. Compuestos volátiles con frecuencia significativa y sus familias compuestas, presentes en naranja y murraya con o sin *D. citri*.**

		Tratamientos			
Familia Compuesta	Naranja Sin <i>D. citri</i>	Naranja Con <i>D. citri</i>	Murraya Sin <i>D. citri</i>	Murraya Con <i>D. citri</i>	
		(+) - delta-cadineno	-	(+) - delta-cadineno	-
		cubedol	cubedol	cubedol	-
1	Hidrocarburos	a-copaeno	a-copaeno	a-copaeno	-
	Sesquihidrocarburos	a-cubebeno	-	a-cubebeno	-
	Terpenos	B-gurjuneno	-	B-gurjuneno	-
		hidrato de cis-sesquisabineno	-	hidrato de cis-sesquisabineno	-
		3-careno	3-careno	-	-
		4-careno	4-careno	-	-
2	Hidrocarburos	b-pineno	b-pineno	-	-
	Monoterpenos	D-limoneno	D-limoneno	D-limoneno	D-limoneno
		<b>p-cimeno</b>	<b>p-cimeno</b>	<b>p-cimeno</b>	-
4	Alcoholes	8-cedren-13-ol	-	8-cedren-13-ol	-
		p-cymen-7-ol	-	p-cymen-7-ol	p-cymen-7-ol
5	Hidrocarburos	xileno	xileno	xileno	xileno
	Aromáticos				
6	Cetonas	4-etil-acetofenona	4-etil-acetofenona	4-etil-acetofenona	4-etil-acetofenona
7	Aldehídos	p-etilbenzaldehído	-	p-etilbenzaldehído	-
8	Ácidos	-	<b>ácido propanoico</b>	-	<b>ácido propanoico</b>
10	Hidrocarburos	a-pineno	a-pineno	a-pineno	a-pineno
	Terpenos				

Mezclas de tres compuestos incluyendo el p-cimeno, genera una estimulación fuerte de las neuronas receptoras de olores, que son activadas por varios de los mismos volátiles liberados por plantas de cítricos, lo cual sugiere que pueden desempeñar un papel importante como atractivos (Coutinho *et al.*, 2014).

Los autores, Lapointe, George, & Hall, 2016, confirmaron un mayor sondeo por parte de adultos de *D. citri* como respuesta a una mezcla optimizada de tres componentes constituida por los ácidos fórmico, acético y el p-cymeno; indicaron que los compuestos que estimulan la alimentación pueden ser nutrientes esenciales o estímulos simbólicos, y que, aunque no hay conocimiento del papel nutricional de estos compuestos, están asociados con procesos metabólicos en plantas de cítricos y por lo tanto validados como fagoestimulantes.

De acuerdo con la base de datos del sitio web, The Pherobase (<http://www.pherobase.com>); el p-cymeno forma parte del mecanismo de comunicación de múltiples familias, géneros y especies de insectos, y según la especie puede funcionar como feromona, alomona, atrayente o kairomona, esto da sentido a nuestra intención de selección para ser utilizado en mezcla como atrayente de *D. citri*; reforzamos esta idea con lo citado por López, Domínguez, Guerrero, & Quero (2021), quienes concluyeron que las antenas de dos especies de lepidópteros fueron más sensibles al p-cymeno y este compuesto indujo actividad electroantennográfica, actuando como posible disruptor del apareamiento de ambas especies interviniendo de esta manera en sus sistemas de comunicación.

Se identificó también que el ácido propanoico fue el único compuesto que apareció tanto para naranja como para murraya únicamente bajo la presencia de *D. citri*; lo cual se discute con mayor amplitud más adelante.

La selección del ácido propanoico presente en nuestra colección de compuestos volátiles se justifica con la referencia encontrada de Zanardi, *et al.*, 2019 quienes previamente identificaron el ácido acético como una feromona sexual putativa y posteriormente midieron fuertes respuestas electroantennográficas provocadas a partir del ácido fórmico y el ácido propanoico. Examinaron a fondo ensayos de comportamiento en interiores (olfatómetro de 4 vías) y prueba de campo la viabilidad de estos tres semioquímicos como señuelos potenciales para atrapar *D. citri*; concluyeron que el ácido fórmico, ácido acético y ácido propanoico en dosis apropiadas son atrayentes específicos para machos y adecuados señuelos para trampas de *D. citri*.

Consideramos importante resaltar que cuantitativamente, a partir de los muestreos realizados, del total de compuestos encontrados, una gran mayoría, fueron encontrados en naranja con un total de 27 y murraya con 19, sin adultos, y que para el caso de los muestreos involucrando adultos y ninfas de *D. citri*, se detectaron menor cantidad de compuestos para naranja y murraya, en cuyo caso se contabilizaron 13 y 11 respectivamente.

Esto indica que la presencia del psílido no significó mayor presencia de compuestos, sin embargo, al tomar en cuenta la calidad de estos y basados en las referencias, los resultados señalan que la presencia del psílido permitió detectar compuestos de mayor potencial, por ejemplo, el ácido propanoico solo fue detectado para naranja y murraya con presencia del psílido. Probablemente el ácido propanoico detectado en las muestras con psílicos no proviene de la planta si no que es liberado por *D. citri*, como Zanardi, O. *et al.*, 2018, demostraron en la determinación de ácidos orgánicos como feromonas de este insecto.

Con los argumentos presentados en los párrafos anteriores, con la presencia de compuestos volátiles orgánicos como el p-cimeno y el ácido propanoico y entendido su potencial como posibles atrayentes para *D. citri*, se procedió a utilizarlos en mezcla para las pruebas de campo respectivas.

### **B. Dinámica en captura de adultos de *D. citri* en pruebas de campo.**

La captura de adultos presentó un incremento para las fechas del 29 de enero y 5 de marzo, con medias de captura entre 9,4 y 18 adultos por trampa y 4 y 11 adultos por trampa para cada fecha respectivamente. Las capturas disminuyeron para los muestreos del 12 de febrero, con medias de captura entre 7,4 y 12,2; alcanzando el punto más bajo el 26 de febrero, con medias de captura entre 0,8 y 2,6. Luego del 5 de marzo tuvieron una leve disminución manteniendo en un promedio estable en 4 fechas de muestreo al finalizar el período de la prueba; figura 9.

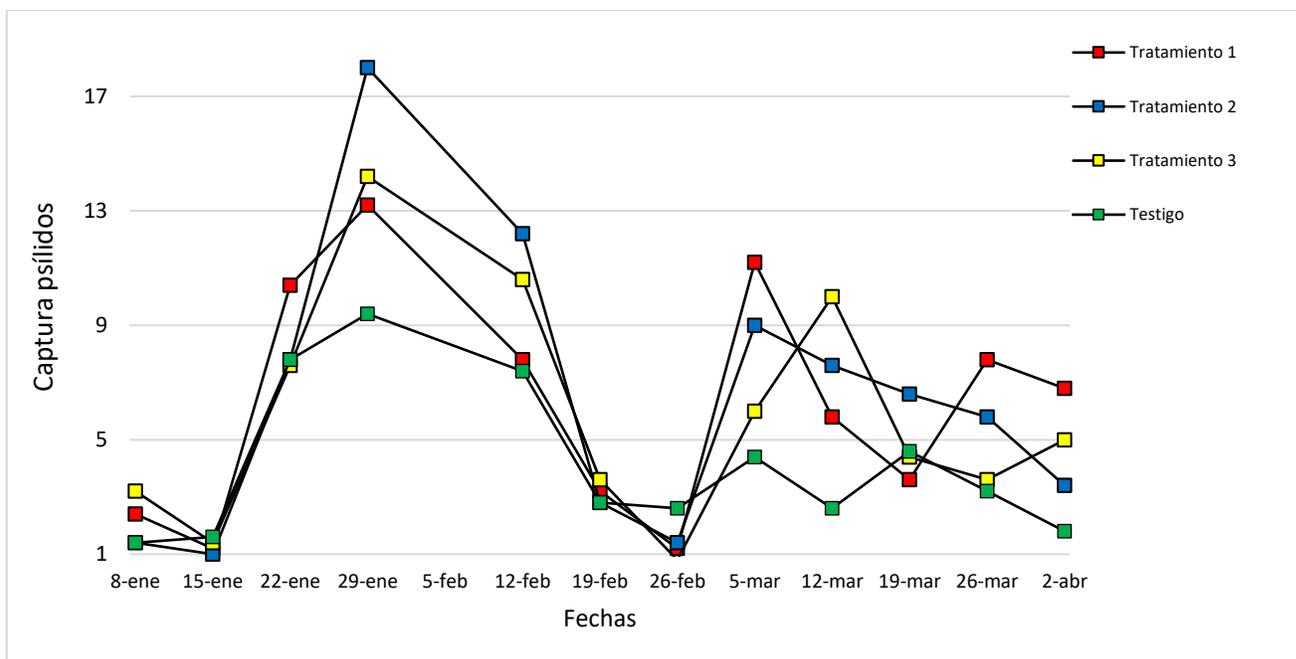


Figura 9. Captura de adultos de *D. citri* por tratamiento y por fecha de muestreo.

### C. Efecto de la precipitación sobre las capturas de *D. citri*.

La dinámica poblacional de *D. citri* obedece a la presencia de brotación nueva en los cítricos en este caso naranja, y dicho comportamiento está relacionado con picos de precipitación. Generalmente, entre 8 y 10 días después que se da un aumento en las lluvias, los árboles de cítricos comienzan a brotar.

Los rebrotes muestran crecimiento simpodial a medida que pasan por etapas de desarrollo predecibles y reconocibles (denominadas ontogenia) que se rigen genética y ambientalmente, con la temperatura, el fotoperiodo, la radiación solar y la lluvia, factores que juegan un papel importante; aunque se pueden encontrar huevos, ninfas o adultos de *D. citri* en brotación reproductiva (floral), la brotación vegetativa representa aparentemente el espacio principal para el desarrollo del psílido. Esto explica la fuerte asociación entre la fenología vegetativa y la dinámica de las poblaciones de *D. citri* en plantaciones de cítricos. El psílido se siente atraído por los brotes que ofrecen condiciones óptimas para la alimentación y la oviposición, especialmente aquellas en la etapa inicial de desarrollo, mediante una combinación de

sustancias químicas volátiles y estímulos visuales. Ha sido conocido que la oviposición ocurre casi exclusivamente en la brotación jóvenes. (Cifuentes Arenas, de Goes, Pedreira de Miranda, Beattie, & Aparecido Lopes, 2018.).

Los brotes tiernos de menos de un centímetro y hasta cinco centímetros se vuelven muy atractivos para que adultos de *D. citri* lleguen a colocar huevos y esto genera incrementos en las poblaciones, lo cual se puede observar en la figura 10; en esta se observa que para el 15 de enero y el 12 de febrero se dieron picos de precipitación de 35 y 31 mm de lluvia por m<sup>2</sup> respectivamente, provocando en cada evento incremento en las poblaciones del *D. citri*, claramente visualizados en las capturas del 29 de enero y 5 de marzo, es decir 15 días después en cada ocasión.

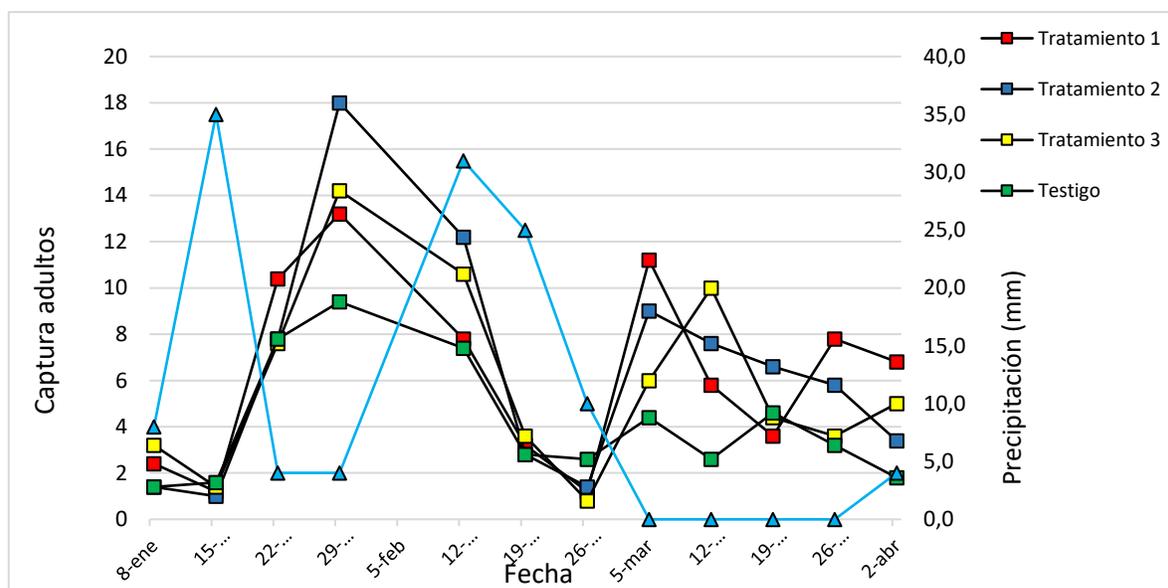


Figura 10. Captura de adultos de *D. citri* por tratamiento y curva de precipitación.

#### D. Efecto de los tratamientos sobre la captura de *D. citri*.

El ensayo se realizó en bloques completamente al azar con tres factores que fueron, el efecto de los tratamientos y el comportamiento de las capturas durante las fechas y su interacción.

De acuerdo con la configuración de los tratamientos, se buscó involucrar compuestos en mezcla que ejerzan un efecto de sinergia sobre adultos de *D. citri* con el propósito de favorecer la interacción entre dos o más sustancias y que el efecto de su combinación sobre el insecto sea mayor que la suma de los efectos individuales; las referencias descritas en párrafos anteriores dan sentido a tal propósito aseverando que los insectos herbívoros a menudo se sienten atraídos por mezclas de volátiles liberados por plantas hospederas, como en el caso Coutinho-Abreu, *et al.*, (2014); quienes usaron señuelos de un solo compuesto y señuelos de compuestos mezclados e identificaron una mezcla de 3 olores (mirceno, butirato de etilo y p-cymeno) a la cual describieron como la mezcla atrayente más prometedora.

La mezcla de estos compuestos favorece una fuerte activación de las neuronas receptoras de olores que potencian o activan el comportamiento de atracción hacia los hospederos en este caso árboles de naranja. El tratamiento uno, constituido principalmente por el ácido propanoico, cuya función fue de participar en mezcla como feromona atrayente, de acuerdo con Zanardi, *et al.*, (2019), la mezcla entre el ácido propanoico, ácido fórmico y ácido acético, en dosis apropiadas funcionan como atrayentes específicos de machos y son buenos señuelos para trampas de *D. citri*.

En el tratamiento dos, siendo el p-cymeno un compuesto bastante consistente en el perfil de volátiles de nuestra colección, se quiso generar una mezcla equivalente a la reportada en la literatura por Coutinho, *et al.*, (2014), en conjunto con mirceno y butirato de etilo, esperando generar una fuerte atracción de adultos de *D. citri* al participar como activadores fuertes de los receptores neuronales de olor y funcionar de manera óptima como atrayentes.

Por su parte el tercer tratamiento, consistió en evaluar si la combinación de los constituyentes de los tratamientos uno y dos, podrían generar un efecto de mayor potencial sinergista atrayente para *D. citri*.

De acuerdo con el análisis estadístico, sólo hubo diferencias significativas para el efecto fecha ( $p=0,0001$  /  $p \leq 0.05$ ); no cumpliendo esta regla ni para la interacción ( $p=0,8509$

) ni para el tratamiento ( $p=0,0777$ ). Con base en la figura 11, se visualiza el efecto significativo de las fechas con respecto a la captura en los cuales, durante el período de prueba se encontraron momentos de captura baja (D), media (C) y alta (A, B).

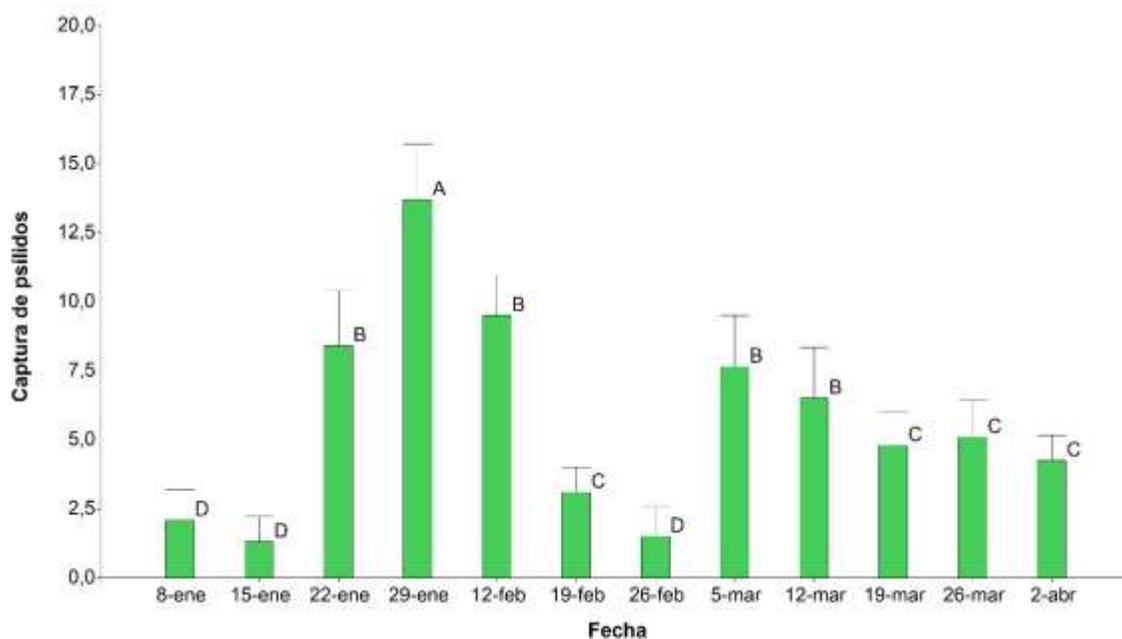


Figura 11. Medias ajustadas y error estándar de la captura de *D. citri* por fecha.

Este comportamiento, puede deberse a la interacción del psílido y las condiciones propias del lote o finca en el cual se desarrolló el trabajo, la influencia de las precipitaciones principalmente como mencionado anteriormente, así como el manejo agronómico ejecutado. A pesar de haber establecido el ensayo en un área de la finca con labranza mínima en cuanto a manejo de malezas y plagas, en dos ocasiones se vieron obligados a realizar aplicaciones con insecticidas en el lote con los tratamientos y alledaños; aplicaciones de insecticida + herbicida fueron aplicados en dos ocasiones, la primera para la semana entre el 29 de enero y 12 de febrero y la segunda para la semana entre el 19 y 26 de marzo.

Estas aplicaciones incidieron directamente en la reducción de las poblaciones del psílido lo cual se vio reflejado en las capturas del 19 y 26 de febrero y por lo tanto en la presencia de adultos deseada para evaluar la influencia de los tratamientos. Es muy probable que por efecto de la segunda aplicación las poblaciones se redujeron de manera similar en días posteriores al dos de abril fecha del último muestreo.

En la figura 12, se presentan los resultados globales de la fase de campo del ensayo. Concentrando las 12 fechas de muestreo, se observa el promedio general por tratamiento, su máximo y mínimo, así como la desviación estándar con respecto a la captura de adultos de *D. citri*. El análisis estadístico reflejó que no existieron diferencias significativas para la variable tratamientos, sin embargo, como indicado en párrafos anteriores la variable fecha evidenció, momentos de captura importantes.

Esta aseveración, nos induce a pensar que, para ganar mayor significancia estadística con respecto a los tratamientos, es factible mejorar pensando en ensayos futuros al menos tres aspectos. Es posible mejorar las mezclas utilizadas en los tratamientos, variando alguno o algunos de los compuestos que acompañan al p-cymeno y el ácido propanoico que favorezcan el sinergismo y por lo tanto la potencia de respuesta como atrayentes.

Otro aspecto para mencionar es el espacio seleccionado para la ejecución del ensayo. La administración de la finca nos facilitó un lote declarado en abandono por decisión interna, esto nos permitiría realizar la prueba en un espacio libre de aplicaciones de insecticidas lo que podría favorecer la incidencia normal de *D. citri*, no obstante, la presencia de adultos en nuestro ensayo comenzó a afectar lotes comerciales lo que obligó la ejecución de aplicaciones afectando las poblaciones que pudieron favorecer nuestras capturas; esto nos indica que sería mejor seleccionar una finca particular en la cual exista la certeza de que durante la ejecución de la prueba no se realicen aplicaciones que interrumpan las capturas.

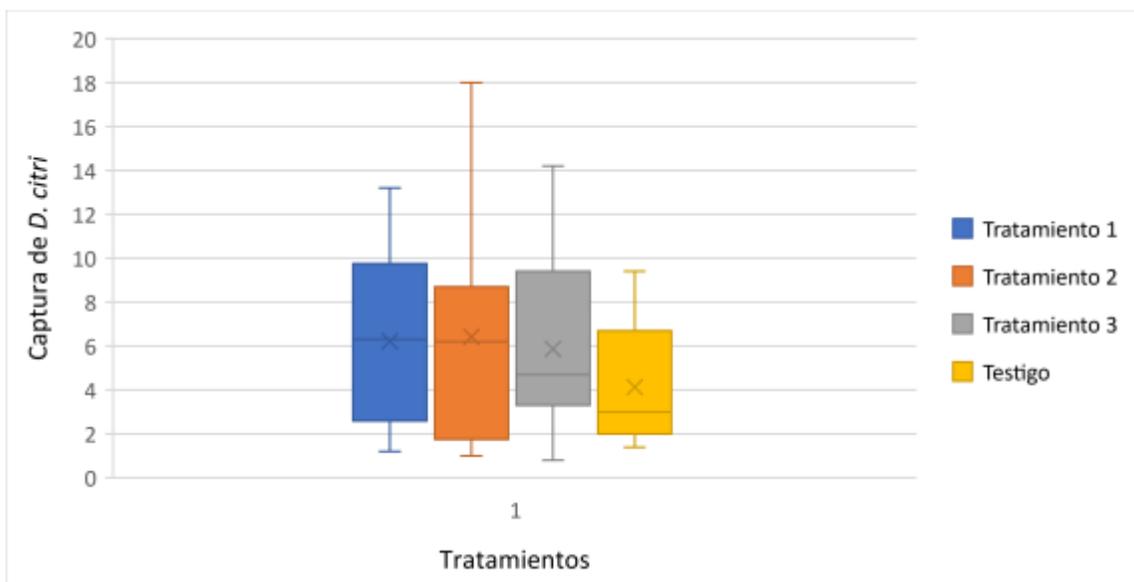


Figura 12. Resultados globales de la captura de *D. citri* por tratamiento.

Nos parece importante también incluir en futuros ensayos la enfermedad del HBL como factor adicional de evaluación, ya que, de acuerdo a referencias en literatura se conoce que árboles afectados por *C. liberibacter* spp, las capturas de adultos y huevos observados son significativamente más altos que en árboles con brotes sanos (Zhao, J. *et al.* 2013)

En resumen, el estudio del perfil de compuestos volátiles en cítricos ha permitido analizar tanto individualmente como en mezclas posibles señuelos que pueden ser utilizados en el desarrollo de estrategias efectivas dentro de programas de manejo integrado de *D. citri*. Al no contar aún con una cura para la enfermedad más importante en la citricultura mundial, el manejo de poblaciones del vector continua significando un tema fundamental en la búsqueda de mitigar el problema.

## XI. CONCLUSIONES

- El compuesto p-cimeno forma parte del perfil de compuestos de *Citrus sinensis* y *Murraya paniculata* con y sin la presencia de *D. citri* y de acuerdo con la literatura presentan potencial atrayente para adultos de esta especie.
- El ácido propanoico aparece en el perfil de compuestos tanto para *Citrus sinensis* y *Murraya paniculata* con la presencia de *D. citri*.
- Existe la posibilidad que, la presencia de *D. citri* pueda inhibir la expresión de compuestos volátiles con potencial insecticida o de atracción de sus enemigos naturales, sin embargo, no se puede asegurar categóricamente por lo que el tema queda abierto para continuar su estudio en trabajos posteriores.
- El efecto de las fechas presentó diferencias significativas ( $p=0,0001 / p \leq 0.05$ ), no así para los efectos de los tratamientos y la interacción entre ambos, en la captura de adultos de *D. citri*; no obstante, la existencia de diferencias numéricas entre tratamientos indica la necesidad de extender las investigaciones con atrayentes hacia fincas con condiciones de manejo mejoradas.

## XII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios con otras mezclas de compuestos que puedan potenciar el efecto atrayente del p-cymene y el ácido propanoico.
- Estudiar porqué la presencia de *D. citri* inhibe la expresión de ciertos compuestos volátiles.
- En ensayos similares, incluir un muestreo de brotación o datos fenológicos que permitan reforzar el análisis de comportamiento de la población de *D. citri* en tiempo y espacio.
- Incluir mayor cantidad de trampas por tratamiento para reforzar el muestreo y la validación de datos experimentales en este tipo de ensayos.

### XIII. REFERENCIAS

- Abdelsalam, N., Salem, M., Ali, H., Mackled, M., EL-Hefny, M., Elshikh, M., & Hatamleh, A. (2019). Morphological, biochemical, molecular, and oil toxicity properties of *Taxodium* trees from different locations. *Industrial Crops & Products*, 1-11.
- Acuña, J. F. (2012). *Cadena agroalimentaria de cítricos*. Puriscal: Ministerio de Agricultura y Ganadería Costa Rica.
- Amorós, M. E., Pereira das Neves, V., Rivas, F., Buenahora, J., Martini, X., Stelinski, L., & Rossini, C. (2019). Response of *Diaphorina citri* (Hemiptera:Liviidae) to volatiles characteristic of spread citrus hosts. *Arthropod-Plant Interactions*, 367-374.
- Araújo Crisostomo, L., & Nawmov, A. (2009). *Adubando para alta produtividade*. Fortaleza, Brasil: Embrapa, Agroindústria Tropical.
- Belasque Jr, J., Takao Yamamoto, P., Pedreira de Miranda, M., Beozzi Bassanezi, R., Juliano Ayres , A., & Marie Bové, J. (2010). Controle do Huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil. *Citrus Research & Technology*, 53-64.
- Borrero Echeverry, F. (2017). Olores complejos: Interacciones entre semioquímicos de diferentes fuentes. *Congreso Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN) Memorias & Resúmenes* (págs. 221-325). Bogotá: Sociedad Colombiana de Entomología.
- Bouvet, J. P., & Hochmaier, V. (2018). *Monitoreo y manejo del psílido asiático, vector de la enfermedad de HLB*. Buenos Aires: Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca.
- Bové, J. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 7-37.
- Burckhardt, D., & Ouvrard, D. (2012). A revised classification of the jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea). *Zootaxa*, 1-34.
- Castellanos Rojas, J. L. (2019). *Evaluación de las funciones ecosistémicas de los enemigos naturales mediadas por volátiles de plantas inducidos por la herbivoría en cultivos de café de la provincia del Sumapaz*. (Tesis de grado). Recuperado de: [http:// repository.unad.edu.co/handle/10596/31830](http://repository.unad.edu.co/handle/10596/31830) .
- Censos, I. N. (2019). *Encuesta nacional agropecuaria 2019 Resultados generales de la actividad agrícola y forestal*. San José, Costa Rica: INEC.
- Céspedes Torres, Y. P. (2012). Peligros del xileno. *Cap&Cua*, 1-11.
- Cicero Jurado, L., Lomas Barrié, C. T., Loeza Kuk, E., Sánchez Borja, M., & Arredondo Bernal, J. C. (2017). *Control del psílido asiático de los cítricos mediante el parasitoide*

*Tamarixia radiata* en el sudeste de México. Mérida, México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

- Cifuentes Arenas, J. C., de Goes, A., Pedreira de Miranda, A., Beattie, G., & Aparecido Lopes, S. (2018). Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. *PLOS One*, 1-17.
- Citrus, F. A. (2018). *La actividad citrícola Argentina*. Buenos Aires: Federcitrus.
- Collins, L., Bryning, G., Wakefield, M., Chambers, J., & Cox, P. (2007). Progress towards a multi-species lure: Identification of components of food volatiles as attractants for three storage beetles. *Journal of Stored Products Research*, 53-63.
- Cortez, V. (2013). Ecología química y perspectivas de su aplicación en la conservación de la biodiversidad. *Cuadernos de Biodiversidad*, 16-21.
- Coutinho-Abreu, I. V., Forster, L., Guda, T., & Ray, A. (2014). Odorants for surveillance and control of the asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*). *PLoS One*, 1-7.
- Díaz Gil, M., Fernández Argudín, M., Cuñarro Cabeza, R., & Méndez Barceló, A. (2019). Evaluación de trampas engomadas para determinar preferencias de altura y color por *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en naranjo "Valencia" de Isla de la Juventud. *Revista digital de Medio Ambiente "Ojeando la agenda"*, 22-32.
- Estado, S. F. (Enero-Febrero de 2018). *Actualidad Fitosanitaria*. San José: Centro de Información y Notificación MAG.
- Fancelli, M., Borges, M., Laumann, R., Pickett, J. A., Birkett, M. A., & Blassioli-Moraes, M. C. (2018). Attractiveness of host plant volatile extracts to the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, is reduced by terpenoids from the non-host cashew. *Journal of Chemical Ecology*, 397-405.
- FAO. (19 de Octubre de 2020). *FAOSTAT*. Obtenido de FAOSTAT: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- García, M., Gonzalez-Coloma, A., Donadel, O., Ardanaz, C., Tonn, C., & Sosa, M. (2007). Insecticidal effects of *Flourensia oolepis* Blake (Asteraceae) essential oil. *Science Direct*, 181-187.
- Grafton-Cardwell, E., Stelinski, L., & Stansly, P. (2013). Biology and management of asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. *Annual Review of Entomology*, 413-432.
- Gutiérrez Bouzán, M., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos de mal olor. *Boletín Intexter*, 35-41.

- Hijaz, F., El-Shesheny, I., & Killiny, N. (2013). Herbivory by the insect diaphorina citri induces greater change in citrus plant volatile profile than does infection by the bacterium, Candidatus Liberibacter asiaticus. *Plant Signaling & Behavior*, 1-10.
- Langsi, J. D., Nukenine, E. N., Oumarou, K. M., Moktar, H., Fokunang, C. N., & Mbata, G. N. (2020). Evaluation of the insecticidal activities of pinene & 3-Carene on Sitophilus zeamais Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Insects*, 1-11.
- Lapointe, S. L., George, J., & Hall, D. (2016). A phagostimulant blend for the asian citrus psyllid. *Journal of Chemical Ecology*, 941-951
- Lin, H., Pietersen, G., Han, C., Alan Read, D., Lou, B., Gupta, G., & Civerolo, E. (2015). Complete genome sequence of “Candidatus Liberibacter africanus,” a bacterium associated with citrus huanglongbing. *Genome A*, 1-2.
- Mann, R. S., Ali, J., Hermann, S., Tiwar, S., Pelz-Stelinsk, K. S., Alborn, H. T., & Stelinski, L. L. (2012). Induced release of a plant-defense volatile ‘Decetively’ attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. *Plos Pathogens*, 1-13.
- Mann, R., Rouseff, R., Smott, J., Castle, W., & Stelinski, L. (2010). Sulfur volatiles from Allium spp. affect asian citrus psyllid, Diaphorina citri Kuwayama (Hemiptera:Psyllidae), response to citrus volatiles. *Bulletin of Entomological Research*, 89-97.
- Marín Loaiza, J., & Céspedes, C. (2007). Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 327-351.
- Marina Cotes, A. (2018). *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros*. Mosquera, Colombia: Agrosavia.
- Monzo, C., Arevalo, H., Jones, M., Vanaclocha, P., Croxton, S., Quereshi, A., & Stansly, P. (2015). Sampling methods for detection and monitoring of the asian citrus psyllid. *Environmental Entomology*, 1-9.
- Mora Aguilera, G., Robles García, P., López Arrollo, J., Flores Sánchez, J., Acevedo Sánchez, G., Domínguez Monge, S., . . . Loeza Kuk, E. (2016). Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 108-119.
- Murugesan, S., Rajeshkannan, C., Suresh Babu, D., Sumathi, R., & Manivachakam, P. (2012). Identification of insecticidal properties in common weed - *Lantana camara* Linn by gas chromatography and mass spectrum (GC-MS-MS). *Pelagia Research Library*, 2754-2759.
- Nieves Silva, E. (Octubre de 2019). *Compuestos volátiles de Prunus persica (L.) para el manejo agroecológico de Macrodactylus nigripes (Coleoptera: Melolonthidae)*. Puebla, México.

- Onagbola, E., Rouseff, R., Smoot, J., & Stelinski, L. (2011). Guava leaf volatiles and dimethyl disulphide inhibit response of *Diaphorina citri* Kuwayama to host plant volatiles. *Journal of Applied Entomology*, 404-4014.
- Patt, J., & Sétamou, M. (2010). Response of the asian citrus psyllid to volatiles emitted by the flushing shoots of its rutaceous host plants. *Chemical Ecology*, 618-624.
- Pelz-Stelinski, K., Brlansky, R., Ebert, T., & Rogers, M. (2010). Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology*, 1531-1541.
- Peris Rodrigo, J. (2020). Ecología de los terpenos volátiles de la piel de la naranja: comunicación planta-frugívoro. Valencia, España.
- R.S. Mann, R. R. (2011). Sulfur volatiles from *Allium* spp. affect asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), response to citrus volatiles. *Bulletin of Entomological Research*, 89-97.
- Rodríguez Baixauli, A. M. (2013). Genetic engineering of plant volatiles in fleshy fruits: pest repellency and disease resistance through D-limonene downregulation in transgenic orange plants. (Tesis de Doctorado, Universitat Politècnica de Valencia) <https://riunet.upv.es/handle/10251/31655>.
- Santivañez C, T., Mora Aguilera, G., Díaz Padilla, G., López Arollo, J. I., & Vernal Hurtado, P. (2013). *Marco estratégico para la gestión regional del huanglongbing en América Latina y el Caribe*. Santiago de Chile: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Santivañez C, T., Mora Aguilera, G., Díaz Padilla, G., López Arrollo, J., & Vernal Hurado, P. (2013). *Marco Estratégico para la Gestión Regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe*. Santiago, Chile: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- The Pherobase*. (28 de Octubre de 2021). Obtenido de The pherobase: <https://www.pherobase.com/database/compound/compounds-detail-p-cymene.php>.
- Tsai, J. H., & Hong Liu, Y. (2000). Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on Four Host Plants. *Journal of Economic Entomology*, 1721-1725.
- Velázquez González, J., Cibrián Tovar, J., Hidalgo Moreno, C., & Vásquez Rojas, T. (2011). Validación del método de aireación dinámica para la captura de compuestos volátiles de *Capsicum* spp. . *Revista Latinoamericana de Química*, 7-16.
- Wenninger, E. J., Stelinski, L. L., & Hall, D. G. (2009). Roles of olfactory cues, visual cues, and mating status in orientation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) to four different host plants. *Chemical Ecology*, 225-234.

- Yamamoto, P. T., Rodriguez Alves, G., & Beloti, V. H. (2014). Manejo e controle do Huanglongbing (HLB) dos cítricos. *Investigação Agrária*, 69-82.
- Yamamoto, P., Paiva, P., & GRavena, S. (2001). Fluctuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera:Psyllidae) em pomares de citros na região norte do estado de São Paulo. . *Neotropical Entomology*, 165-170.
- Zanardi, O. Z., Volpe, H. X., Favaris, A. P., Silva, W. D., Luvizotto, R. A., Magnani, R. F., . . . Leal, W. S. (2018). Putative sex pheromone of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, breaks down into an attractant. *Scientific Reports*, 1-11.
- Zanardi, O., Volpe, H., Luvizotto, R., Magnani, R., Gonzalez, F., Calvo, C., . . . Leal, W. (2019). Laboratory and field evaluation of acetic acid-based lures for male Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Scientific Reports*, 1-10.
- Zhao, J.-p., Wang, H.-t., Zeng, X.-n., & Xue, P.-p. (2013). Differences in selection behaviors and chemical cues of adult Asian citrus psyllids, *Diaphorina citri*, on healthy and Huanglongbing-infected young shoots of citrus plants. *Journal of Agricultural Science*, 83-91.