

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Patogenicidad de *Isaria fumosorosea* Wize (Ascomycota: Hypocreales) Contra *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) y otros Insectos Plaga

Por:

**JULIO NARCIZO EK MAAS**

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Patogenicidad de *Isaria fumosorosea* Wize (Ascomycota: Hypocreales) Contra  
*Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) y otros Insectos Plaga

Por:

**JULIO NARCIZO EK MAAS**

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Aprobada

Dr. Sergio René Sánchez Peña  
Asesor Principal

  
Dr. J. Isabel López Arroyo  
Coasesor  
M.C. Rebeca Casique Valdés  
Coasesor  
Dr. Leobardo Bañuelos Herrera  
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Coordinación  
División de Agronomía

Junio, 2012

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.* Gracias por darme los conocimientos para ponerlos en práctica, y por darme lo necesario para salir adelante.

*Al Dr. Sergio René Sánchez Peña.* Gracias por sus enseñanzas, por su amistad y disponibilidad en la preparación y revisión de este proyecto.

*Al Dr. José Isabel López Arroyo.* Por la oportunidad y el apoyo que me otorgo para realizar este proyecto de investigación.

*Al proyecto FONSEC SAGARPA-CONACYT número 2009-108591.* Por los fondos otorgados para la presente investigación.

*Al Dr. Oswaldo García Martínez.* Por ser mi tutor de licenciatura y por sus consejos.

*Al Dr. Santiago Vergara Pineda.* Por sus enseñanzas del servicio social.

*A la M.C. Rebeca Casique Valdés.* Por sus enseñanzas, generosidad y por su grandiosa participación en este proyecto.

*A la M.C. Reyna Ivonne Torres Acosta.* Por su ayuda a realizar este trabajo.

*Al Ing. Oscar Ángel Sánchez Flores.* Por su contribución en este trabajo, en la revisión y en otorgar formato electrónico a este proyecto.

*Al Ing. Edgar Daniel Lara Sánchez.* Por su ayuda, motivación y por sus recomendaciones.

*Al Ing. Juan Alberto Aguirre Barragán.* Por su amistad, y por ser parte de mi formación profesional.

*Al Ing. Jesús Trinidad Barajas Salas.* Por compartirme sus conocimientos y por su amistad.

*Al Ing. Cesar Chávez Robles.* Por su participación en mi formación profesional.

*A Larry Jacobs y Sandra Belin.* Por su apoyo, maravillosa amistad, bondad, y por contribuir en mi preparación en otorgarme la oportunidad de poner mis conocimientos en las prácticas profesionales.

*A John Graham.* Por su Amistad, su buen humor, y generosidad.

## DEDICATORIA

*A mis padres:*

*Marcelo Ek Balam*

*y*

*María del Carmen Maas Koyoc*

Por su gran apoyo, su amor, comprensión, confianza, motivación para que me supere día con día, por darme lo necesario para salir adelante y por estar pendiente de mí a lo largo de mi vida.

*A mis hermanos:* Israel, Carlos, Pedro, y José. Gracias por su apoyo y los buenos momentos compartidos.

*A mis hermanas:* Marisol, Rosa, Natalia, y Sol. Gracias por su apoyo y por alegrarme la vida.

*A mi Abuelo:* Casimiro Maas May, por sus sabios consejos.

*A mi Amor:* A ti que estuviste, estas y estarás conmigo en la trayectoria de mi vida.

*A la Generación CXII de Parasitología.*

A Todos mis grandes amigos por acompañarme en las buenas y en las malas en especial a Braulio, José Eduardo (Chango), Oscar Ángel, José Luis Guerra (Chovi) Emanuel Pardo, Roberto (Chilango), Gabriel (Jipi), Alfonso (Conejo), Jonathan (Demo), Edilberto, Luigi, Eleael Tablas y a mis amigos del Cabo, y a todas las personas que tuve y tendré el honor de conocer. Gracias y discúlpeme si no están en la lista pero seguro están en mi corazón.

*A tú Dios:* Es para ti, una muestra del fruto de tu compañerismo.

*Para llegar al éxito se requiere 99 % de trabajo y 1 % de talento, muchas gracias a todos los que directamente e indirectamente apoyaron no solo en este trabajo sino también en mi vida profesional.*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN .....	XII
ABSTRACT .....	XIV
INTRODUCCIÓN .....	1
Objetivo general.....	2
Objetivos específicos .....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
<i>Diaphorina citri</i> .....	5
Clasificación taxonómica .....	5
Biología y ciclo de <i>Diaphorina citri</i> .....	5
Morfología.....	7
Importancia de <i>Diaphorina citri</i> .....	8
Plantas hospederas .....	9
Huanglongbing.....	10
Síntomas del HLB.....	10
Diagnóstico del HLB .....	11
Métodos de control del psílido asiático de los cítricos <i>Diaphorina citri</i> .....	12
Control químico .....	12
Control biológico.....	13
Hongos entomopatógenos.....	14
Condiciones adecuadas de hongos entomopatógenos .....	15
<i>Isaria fumosorosea</i> Wize. ( <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> ).....	15
Clasificación Taxonómica.....	16
Características de <i>Isaria fumosorosea</i> (Wize) Brown & Smith .....	16
Modo de Acción.....	17
Espectro de acción .....	17
Medios de aislamiento de los hongos entomopatógenos .....	18
Formulación de hongos entomopatógenos.....	20

Insectos de interés agrícola .....	20
<i>Tenebrio molitor</i> (gusano de las harinas) .....	20
<i>Empoasca</i> sp. (chicharrita) .....	21
<i>Bemisia tabaci</i> (mosquita blanca) .....	21
<i>Rhopalosiphum maidis</i> (Fitch) (pulgón del maíz) .....	22
MATERIALES Y METODOS .....	23
Localización .....	23
Obtención de la cepa .....	23
Medios de cultivo .....	23
Producción de <i>Isaria fumosorosea</i> en papa dextrosa agar (PDA) .....	23
Producción de blastosporas de <i>Isaria fumosorosea</i> .....	24
Producción de <i>Isaria fumosorosea</i> por método bifásico .....	25
Técnicas analíticas .....	25
Conteo de esporas .....	25
Viabilidad .....	25
Condición y descripción de los bioensayos efectuados con <i>Isaria fumosorosea</i> ....	26
Diseño Experimental .....	33
Análisis de datos .....	34
RESULTADOS .....	36
DISCUSIÓN .....	57
LITERATURA CITADA .....	59

## ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
<b>Cuadro 1.</b> Bioensayo con blastosporas de <i>I. fumosorosea</i> a diferentes concentraciones contra <i>Bemisia tabaci</i> . T20= Tween20.....	27
<b>Cuadro 2.</b> Bioensayos con blastosporas de <i>I. fumosorosea</i> a diferentes concentraciones contra <i>Empoasca</i> sp. T20= Tween20.....	28
<b>Cuadro 3.</b> Bioensayo con blastosporas de <i>I. fumosorosea</i> a diferentes concentraciones contra <i>Rhopalosiphum maidis</i> . T20= Tween20.....	29
<b>Cuadro 4.</b> Bioensayo de <i>I. fumosorosea</i> a diferentes formulaciones contra <i>Tenebrio molitor</i> . .....	30
<b>Cuadro 5.</b> Bioensayos evaluados en laboratorio de <i>I. fumosorosea</i> contra <i>Diaphorina citri</i> . .....	31
<b>Cuadro 6.</b> Infección en campo de <i>Isaria fumosorosea</i> contra <i>Diaphorina citri</i> .....	33
<b>Cuadro 7.</b> Análisis de varianza de la variable mortalidad de <i>Bemisia tabaci</i> a los 10 días. ....	38
<b>Cuadro 8.</b> Comparación de medias de la variable mortalidad de <i>Bemisia tabaci</i> a los 10 días. ....	39
<b>Cuadro 9.</b> Análisis de varianza de la variable, mortalidad de <i>Empoasca</i> sp. a los 10 días después de la aplicación. ....	40
<b>Cuadro 10.</b> Comparación de medias de la variable mortalidad de <i>Empoasca</i> sp. a los 10 días.....	40
<b>Cuadro 11.</b> Análisis de varianza de la variable mortalidad de <i>Rhopalosiphum maidis</i> a los 10 días.....	42
<b>Cuadro 12.</b> Comparación de medias de la variable mortalidad de <i>Rhopalosiphum maidis</i> a los 8 días. ....	42
<b>Cuadro 13.</b> Análisis de varianza de la variable, mortalidad de <i>Tenebrio molitor</i> a diferentes formulaciones. ....	44
<b>Cuadro 14.</b> Comparación de medias de la variable mortalidad de <i>Tenebrio molitor</i> a los 10 días.....	45

<b>Cuadro 15.</b> Análisis de varianza de la variable mortalidad de <i>Diaphorina citri</i> por diferentes formulaciones y formas de producción de <i>I. fumosorosea</i> después de 10 días de su aplicación.....	48
<b>Cuadro 16.</b> Comparación de medias de la variable mortalidad de <i>Diaphorina citri</i> a los 10 días.....	49
<b>Cuadro 17.</b> Análisis de varianza de la variable, mortalidad de <i>Diaphorina citri</i> causada por la aplicación de <i>I. fumosorosea</i> en campo. ....	52
<b>Cuadro 18.</b> Comparación de medias de la variable mortalidad de <i>Diaphorina citri</i> en campo. ....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> En el ciclo de vida de <i>D. citri</i> pueden reconocerse tres estados: huevos, ninfas y adultos. ....	6
<b>Figura 2.</b> Huevos de <i>D. citri</i> Douglas L. Caldwell, University of Florida. ....	7
<b>Figura 3.</b> Secresiones serosas de <i>D. citri</i> . ....	7
<b>Figura 4.</b> Características del adulto de <i>D. citri</i> (por Michael Rogers, UC). ....	8
<b>Figura 5.</b> Daño directo de <i>D. citri</i> en brotes de cítricos, causando defoliación, y muerte de ramas. ....	9
<b>Figura 6.</b> Síntomas de HLB observados en plantaciones cítricas A: hojas con el síntoma de moteado asimétrico difuso; B: brotes cloróticos; C: Hojas con el síntoma de deficiencias de Zn; D: fruto de naranjo con semillas abortadas y de color marrón pedúnculo hundido y nervios amarillos; E: fruto de naranjo deformado con la columela torcida; F: hoja con nervios corchosos; G: hoja con nervios amarillos. ....	11
<b>Figura 7.</b> <i>Isaria fumosorosea</i> infectando a ninfa de <i>D. citri</i> .....	14
<b>Figura 8.</b> Características microscópicas y macroscópicas de <i>Isaria</i> spp. A. Esquema de conidióforos y conidias de <i>Isaria</i> spp. Dibujo tomado de Malloch (1997) B. Micrografía de conidióforos y conidias de <i>Isaria fumosorosea</i> Fotografía tomada de Herrera (2001). ....	17
<b>Figura 9.</b> Esquema del crecimiento de hongos en FS (Modificado de Rahardjo y col, 2002). ....	19
<b>Figura 10.</b> Principales estadios de desarrollo <i>Tenebrio molitor</i> . ....	21
<b>Figura 11.</b> Concentración de esporas de <i>I. fumosorosea</i> en diferentes medios de cultivo. ....	36
<b>Figura 12.</b> Viabilidad e Infección de <i>I. fumosorosea</i> producida en diferentes medios. ....	37
<b>Figura 13.</b> Mortalidad de <i>Bemisia tabaci</i> por la formulación Tween20 e <i>I. fumosorosea</i> . ....	39
<b>Figura 14.</b> Mortalidad de <i>Empoasca</i> sp. por la formulación de Tween20 e <i>I. fumosorosea</i> . ....	41

<b>Figura 15.</b> Mortalidad de <i>Rhopalosiphum maidis</i> por la formulación de Tween20 e <i>I. fumosorosea</i> . .....	43
<b>Figura 16.</b> Infección de <i>Tenebrio molitor</i> por la formulación de <i>I. fumosorosea</i> aceite y emulsión. ....	46
<b>Figura 17.</b> Mortalidad de <i>Tenebrio molitor</i> por la formulación de <i>I. fumosorosea</i> en talco, tierra de diatomeas y savia de nopal. ....	47
<b>Figura 18.</b> Infección de <i>Diaphorina citri</i> por la formulación de esporas de <i>I. fumosorosea</i> en Tween20 y aceite. ....	50
<b>Figura 19.</b> Infección de <i>Diaphorina citri</i> por la formulación de blastosporas y esporas de <i>I. fumosorosea</i> en aceite. ....	51
<b>Figura 20.</b> Infección en campo de <i>Diaphorina citri</i> por la formulación de <i>I. fumosorosea</i> y Tween20 de 1 a 2 aplicaciones con dos formas de incubación. ....	54
<b>Figura 21.</b> Infección en campo de <i>Diaphorina citri</i> por la formulación de <i>I. fumosorosea</i> en emulsión a 1 y 2 aplicaciones a 2 incubaciones. ....	55

## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue el de determinar la mejor formulación para el uso del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* Wize contra el vector de la enfermedad Huanglongbing, el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) así como otras especies plaga de los cultivos y granos almacenados de México. Se evaluó la eficiencia de la formulación en base a la concentración, viabilidad e infección de *I. fumosorosea* en diferentes formas de producción. Para la producción de esporas de *I. fumosorosea* en medio PDA, se obtuvo una concentración de  $5 \times 10^7$  esporas / mL, viabilidad de 80 % y se registró el 60 % de infección en adultos de *Diaphorina citri*; referente a la producción por blastosporas se logró una concentración de  $1.1 \times 10^8$  blastosporas / mL, viabilidad del 90 % y un 60 % de infección; en la producción con arroz la concentración fue de  $3.3 \times 10^7$  esporas / mL, viabilidad de 85 % y 60 % de infección y con la forma de producción bifásica la concentración fue de  $2.4 \times 10^8$  esporas / mL con 90 % de viabilidad y 70 % de infección en adultos de *Diaphorina citri*.

En los bioensayos realizados en laboratorio la máxima infección a los 10 días después de la aplicación fue obtenida con la concentración de  $1 \times 10^7$  blastosporas / mL de *I. fumosorosea* formulado con Tween20 al 0.025 %; para mosquita blanca (*Bemisia tabasi*) la infección fue de 80 %. En la chicharrita (*Empoasca* sp.) la infección fue de 90 %; en el caso del pulgón del maíz (*Rhopalosiphum maidis*) la infección fue de 80 % a los 8 días de aplicados. También se evaluaron diferentes formulaciones con larvas de *Tenebrio molitor* aplicados tópicamente con el objetivo de encontrar una formulación más eficaz que el aceite y el Tween20; las diferentes formulaciones de *I. fumosorosea* produjeron el siguiente porcentaje de infección a los 10 días de la aplicación: aceite 1 %,  $1.5 \times 10^6$  esporas / mL, 68 % de infección; talco 2.5 %,  $9 \times 10^7$  esporas / mL, 18 % de infección; tierra de diatomeas 2.5 %,  $7 \times 10^6$  esporas / mL, 0% de infección; savia de nopal 1 %,  $1.8 \times 10^6$  esporas / mL, 6.2 % de infección; y emulsión Tween20 0.025 %,  $1 \times 10^6$  esporas / mL, 100 % de infección.

Con los bioensayos en laboratorio realizados con adultos de *Diaphorina citri* se utilizó una concentración de esporas de *I. fumosorosea* de  $1 \times 10^8$  esporas / mL; la evaluación a los 10 días después de la aplicación del hongo mostró que la formulación con Tween20 produjo una tasa de infección de 62 %. La formulación aceite y blastosporas obtenidas de medio de cultivo líquido produjo una infección de 54 %; la formulación aceite y esporas producidas en granos de arroz la infección causada fue de 82 % y para la formulación aceite con esporas producidas en PDA la infección fue de 66 %.

En Martínez de la Torre, Veracruz, se evaluó la aplicación en campo de *I. fumosorosea* a una concentración de  $5.6 \times 10^7$  esporas / mL, a diferentes formulaciones y evaluando la condición de incubación del hongo, con la eficiencia alcanzada con 1 a 2 aplicaciones. Se obtuvo que la formulación Tween20 con una aplicación reportó infección de 70 %; con dos aplicaciones la infección obtenida fue de 54 %. La formulación en emulsión con una aplicación produjo 39 % de infección; con dos aplicaciones la infección obtenida fue de 31 %. Los resultados obtenidos sugieren un gran potencial para el uso de *I. fumosorosea* contra los insectos plaga contemplados en el presente estudio.

**Palabras clave:** *Diaphorina citri*, Control biológico, *Isaria fumosorosea*, medios de cultivo de hongos.

## ABSTRACT

The intention of this research was to determine the best formulation for the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* Wize against the Asian Citrus Psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) who vectors the Huanglongbing disease and other pest species of crops and stored grain in Mexico. We evaluated the effectiveness of the formulation based on the concentration of spores, viability and infection caused by *I. fumosorosea* in different forms of production. For spore production in PDA medium, we obtained a concentration of  $5 \times 10^7$  spores / mL, 80 % of germination, and 60 % of infection in *Diaphorina citri* adults; concerning the production of blastospores, a concentration of  $1.1 \times 10^8$  spores / mL was achieved with a viability of 90 % and 60 % of infection in *Diaphorina citri* adults; the production in rice was  $3.3 \times 10^7$  spores / mL, with a viability of 85 % and 60 % of infection and for biphasic form, we obtained a concentration of  $2.4 \times 10^8$  spores / mL with 90 % viability and 70 % infection in *Diaphorina citri* adults.

In laboratory bioassays the maximum infection at 10 days after the application was obtained with a concentration of  $1 \times 10^7$  blastospores / mL of *I. fumosorosea* formulated with 0.025 % Tween20; for whitefly (*Bemisia tabaci*) the infection was 80 %, 90 % of infection for leafhopper (*Empoasca* sp.), 80 % of infection in the case of the corn aphid (*Rhopalosiphum maidis*) at 8 days of exposure. We also evaluated different formulations with larvae of *Tenebrio molitor* applied topically with the purpose of finding a formulation more effective than oil and Tween20; the different formulations of *I. fumosorosea* at 10 days of the application induce the following infection: oil 1 %,  $1.5 \times 10^6$  spores / mL = 68 % of infection, 2.5 % talc,  $9 \times 10^7$  spores / mL, 18 % of infection, 2.5 % diatomaceous earth,  $7 \times 10^6$  spores / mL, 0 % of infection, 1 % cactus sap,  $1.8 \times 10^6$  spores / mL, 6.2 % of infection and 0.025 % Tween20 emulsion,  $1 \times 10^6$  spores / mL, 100 % of infection. In laboratory bioassays with adults of *Diaphorina citri*, we used a concentration of  $1 \times 10^8$  spores / mL, and the evaluation within 10 days after application of the fungus showed that the

formulation with Tween20 produced an infection rate of 62 %. Oil formulation and blastospores obtained from liquid culture medium produced a 54 % infection; oil formulation and spores produced in the rice grains infection was 82 % and the oil formulation with spores produced on PDA, produced 66 % of infection.

The evaluation on the field was realized In Martinez de la Torre, Veracruz, we evaluated the application of *I. fumosorosea* at  $5.6 \times 10^7$  spores / mL, in different formulations and evaluating the condition of incubation of the fungus, with the efficiency achieved with 1 to 2 applications. It was found that Tween20 with one application, produced infection of 70 % and with two applications, we registered 54 % of infection. The emulsion formulation with one application produced 39 % of infection; with two applications was 31 %. The results suggest a great potential for the use of *I. fumosorosea* against insect pests referred to in this study.

**Key words:** *Diaphorina citri*, biological Control, *Isaria fumosorosea*, culture mediums of fungi.

## INTRODUCCIÓN

Para México, la citricultura representa una actividad de mucha importancia dentro de la fruticultura nacional. De la superficie establecida, el 68.5 % corresponde a naranja, 20.5 % a limón mexicano, 5.2 % a limón persa, y el resto a mandarina, tangerina y pomelo (Sánchez, 2005).

La producción de naranja, limón mexicano y limón persa ocupan el mayor porcentaje de los cítricos establecidos. Dentro de la producción nacional de cítricos (naranja, limón, mandarina, toronja y lima) participan 67 mil familias mexicanas, generando alrededor de 70 mil empleos directos y 250 mil indirectos en los diversos procesos de la cadena productiva. La citricultura es una actividad redituable en aspectos económicos para los productores, ecológicos e importante desde el punto de vista social al generar empleos durante todo el año (Dirección General de Fomento a la Agricultura, 2007).

La superficie cultivada nacional para el 2008 fue de 549 mil hectáreas, el 75 % conformado por 6 estados: Veracruz, San Luis Potosí, Michoacán, Tamaulipas, Colima y Nuevo León, con una producción nacional de 7.2 millones de toneladas, con un valor superior a los 10 mil millones de pesos (SIAP, 2008).

A partir del año 2009 la citricultura nacional ha sido amenazada por la presencia de una enfermedad bacteriana conocida como Huanglongbing (HLB), considerada mundialmente una de las enfermedades más graves de los cítricos (Bové, 2006).

*Diaphorina citri* causa daño a la planta principalmente por la transmisión del patógeno *Candidatus Liberibacter spp.*, una bacteria restringida al floema, causante del “Huanglongbing” (antes “greening”) (Xu *et al.*, 1988, EPPO/CABI, 1996; Garnier y Bové, 2000), enfermedad que es considerada más devastadora que la tristeza de los

cítricos (Da Graca, 1991; Halbert, 1999; Da Graca y Korsten, 2004). Además, el insecto al alimentarse de la planta es capaz de provocar defoliación y muerte de ramas; causar daños severos en los puntos de crecimiento de las plantas (brotes), reducción en el tamaño de la fruta, desarrollo asimétrico, aborto de semilla y falta de jugo. Infestaciones altas de este insecto también originan abundantes secreciones de mielecilla, favorece la presencia y desarrollo del hongo de la fumagina, la cual afecta el vigor de los árboles al interferir el proceso de la fotosíntesis (Halbert y Manjunath, 2004). El rango de huéspedes de *D. citri* evidentemente está restringido a cítricos y especies cercanas de la familia Rutaceae. Dentro de los cítricos destacan el limón, lima, y toronja; la planta ornamental *Murraya paniculata* (L.) Jack, es el hospedero preferido (Halbert, 1999; EPPO, 2005).

De los diferentes agentes utilizados en el control biológico, los hongos entomopatógenos son los únicos capaces de infectar a los insectos chupadores gracias a su poder de penetración de la cutícula (Lacey y col., 1996). En un estudio realizado en Cuba sobre hongos entomopatógenos, Álvarez *et al.*, (1994), encontraron en árboles de limón Mexicano *Citrus aurantifolia* Swingle y en plantas de *Murraya paniculata* (L.) Jack., ninfas y adultos de *D. citri*, parasitados por *Hirsutella citriformis* Speare, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Paecilomyces* sp. (*Isaria* sp.), éste último afectando solamente adultos del psílido. La presente investigación pretende encontrar alternativas ecológicas para el manejo del vector del HLB y otros insectos plaga de interés para la agricultura mexicana.

### **Objetivo general**

Determinar la mejor formulación para el uso del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* Wize contra el vector de la enfermedad Huanglongbing, el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) así como otras especies plaga de los cultivos y granos almacenados de México.

## Objetivos específicos

- 1) Evaluar la mayor cantidad de producción de esporas de *Isaria fumosorosea* obtenidos en diferentes medios de cultivos y determinar la mayor viabilidad y el promedio de mortalidad por infección generada.
- 2) Evaluar la mayor mortalidad por infección a diferentes concentraciones de blastosporas de *Isaria fumosorosea* contra: *Empoasca* sp., *Bemisia tabaci* y *Rhopalosiphum maidis*.
- 3) Determinar la mejor formulación en base a mortalidad por infección de *Isaria fumosorosea* en: Aceite, emulsión, tierra de diatomeas, talco, savia de nopal y Tween20 contra larvas de *Tenebrio molitor*.
- 4) Evaluar en laboratorio la mortalidad por infección a diferentes formas de producción de *Isaria fumosorosea* contra *D. citri*.
- 5) Determinar en campo la mortalidad causada por *Isaria fumosorosea* en las siguientes condiciones: formulación Tween20 y emulsión, incubación de *I. fumosorosea* con *D. citri*, y por último con el número de aplicaciones.

## REVISIÓN DE LITERATURA

Numerosos organismos causan pérdidas económicas en las plantaciones de cítricos en todo el mundo, pero en los últimos años se ha centrado la atención en el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), que constituye una de las plagas más devastadoras para la citricultura mundial (Beattie, G.A. y Smith, D., 1993). Existen al menos, otras seis especies del género *Diaphorina* que también han sido informadas sobre cítricos y otras plantas emparentadas, ellas son: *Diaphorina amoena* Capener, *Diaphorina auberti* Hollis, *Diaphorina communis* Mather y Aubert, *Diaphorina murrayi* Kandasamy, *Diaphorina punctulata* (Petty) y *Diaphorina zebrana* Capener. Las especies *D. amoena* y *D. auberti* pueden separarse de *D. citri* a través del patrón alar. Las alas delanteras de *D. communis* son casi completamente oscuras, lo que hace que se diferencie fácilmente de *D. citri*.

El psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama y el psílido africano de los cítricos, *Trioza erythrae* (Guercio) (Hemiptera: Psyllidae), son dos de las plagas más serias de los cítricos a nivel mundial (Aubert, 1987). Sin embargo *D. citri* es reportada como el vector más eficiente de esta enfermedad (Tsai *et al.*, 2002).

En México, la presencia del psílido asiático de los cítricos año 2002 en los estados de Campeche y Quintana Roo; posteriormente, en un período de seis años fue registrado en el resto de las áreas citrícolas del país (Miranda-Salcedo y López-Arroyo, 2009). En Julio de 2009 se encontraron los primeros psílicos y árboles con la bacteria causante del HLB en Tizimín, Yucatán (SENASICA., 2010).

## ***Diaphorina citri***

### **Clasificación taxonómica**

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda.

Clase: Insecta.

Orden: Hemiptera.

Familia: Psyllidae.

Género: *Diaphorina*.

Especie: *D. citri* Kuwayama.

(Triplehorn y Johnson, 2005).

### **Biología y ciclo de *Diaphorina citri***

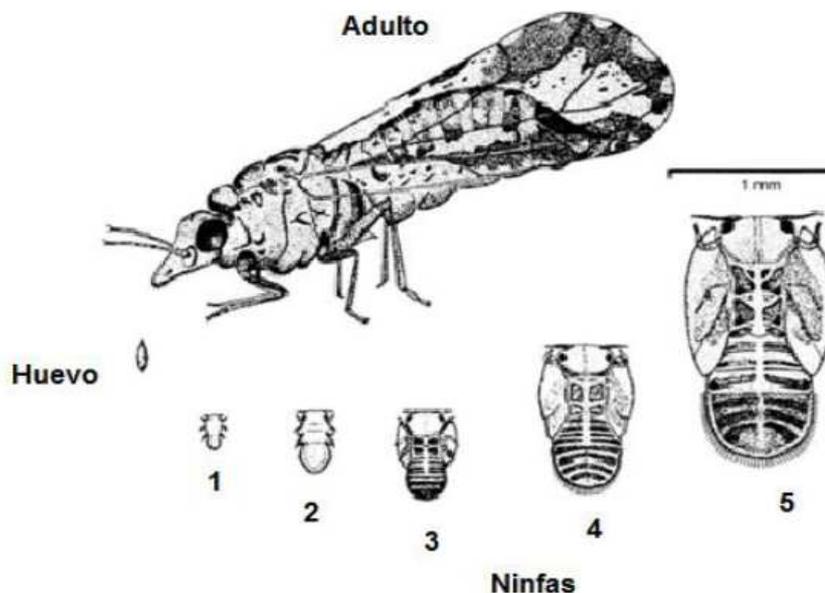
El psílido asiático de los cítricos (ACP) presenta un ciclo de vida corto y una alta capacidad de reproducción, especialmente en áreas costeras calurosas (Catling, 1970). En la figura 1, se muestra el ciclo de vida compuesto de huevo, cinco instares ninfales y adulto; a temperatura de 24 °C los huevos eclosionan entre 4.1 y 4.3 días, y sus cinco instares pueden tener una duración de 12.6 a 13.5 días, de acuerdo al hospedero que utilicen (Tsai y Liu, 2000).

Las hembras de *D. citri* sólo ovipositan en ramas tiernas y en la ausencia de éstas, cesan la oviposición temporalmente (Tsai y Liu, 2000). Se ha observado que las hembras adultas durante su vida ponen 500 a 800 o más huevos durante un periodo de dos meses con un máximo de 1900 (Husain y Nath 1927, Pruthi y Batra 1938, Tsai y Liu 2000, Nava *et al.* 2007). Las ninfas excretan una sustancia blanca cerosa a manera de hilos que se deposita sobre las hojas (García, 2009; Mead, 2007).

Los adultos nuevos alcanzan la madurez reproductiva dentro 2 o 3 días y la ovoposición comienza a partir de 1 o 2 días después del apareamiento (Wenninger y Hall 2007, citado por Hall 2008). Los adultos de *D. citri* frecuentemente se encuentran en reposo en la porción terminal de las ramas o brotes de las plantas donde se alimentan, si la planta está infectada el psílido adquiere el patógeno en 30 minutos (Roistacher, 1991). *D. citri* trasmite es la versión asiática de la enfermedad y es capaz de desarrollar y transmitir la bacteria a 30°C (Bove, 2006).

No presentan diapausa, las poblaciones son bajas en invierno (época seca). Puede haber de 9 a 10 generaciones al año (Mead, 2007). Tanto las altas como las bajas temperaturas son perjudiciales para el incremento de su densidad poblacional (Adwal *et al.*, 1958).

El aparato genital permite la distinción entre los sexos. El dimorfismo sexual, a pesar de no ser muy acentuado, permite distinguir al macho de la hembra por presentar los ojos compuestos más rojizos y el abdomen pequeño (Fernández *et al.*, 2005).



**Figura 1.** En el ciclo de vida de *D. citri* pueden reconocerse tres estados: huevos, ninfas y adultos.

## Morfología

### Huevos

El tamaño promedio de un huevo aparece en la literatura de 0.31mm de longitud y 0,14 mm de ancho, alargado y de forma oval (Tsai y Liu, 2000). Son colocados generalmente en el extremo de los brotes tiernos, sobre y entre las hojas desplegadas, apareciendo con frecuencia un gran número en una misma ramita (Fig. 2).



**Figura 2.** Huevos de *D. citri* Douglas L. Caldwell, University of Florida.

### Ninfas

Posee cinco instares ninfales muy parecidos que varían en tamaño después de cada muda. En dependencia del instar ninfal, la longitud varía desde 0.25 hasta 1.7 mm y generalmente son de color amarillo naranja (Tang, L.C. y Su, T.H. 1984). Se alimentan exclusivamente de los brotes jóvenes, sobre todo los primeros tres instares. En el transcurso de los días aumentan de tamaño, se mueven lentamente sobre la planta hospedante dejando como huella la cera que expelen por la estructura anal (Fig. 3).



**Figura 3.** Secresiones serosas de *D. citri*.

## Adultos

El patrón de la venación es la típica de los psílicos; el segundo par es membranosa transparente (Fig. 4); en la literatura aparecen reflejados diversos intervalos para la talla de los adultos. Así, se plantea que mide de 3-4 mm de longitud, con una coloración pardo a ceniza (Halbert y Manjunath, 2004) o cuerpo marrón claro moteado, recubierto de polvo ceroso y con los ojos rojos (SENASA 2006). Las antenas presentan el ápice negro con dos manchas marrón claro en la parte media. Las alas son más anchas que el tercio apical. (Cermeli *et al.*, 2000). Se alimentan por el envés de las hojas (Grafton *et al.*, 2006). Los machos son levemente más pequeños que las hembras, el abdomen de la hembra termina en una punta bien marcada, se torna rojizo o anaranjado antes de ovipositar (García, 2009; Carter, 2009).



**Figura 4.** Características del adulto de *D. citri* (por Michael Rogers, UC).

## Importancia de *Diaphorina citri*

*D. citri* causa daño a la planta primariamente por la transmisión del patógeno *Candidatus Liberibacter spp.*, una bacteria restringida al floema, causante del “Huanglongbing” (antes “greening”) (Xu *et al.*, 1988, EPPO/CABI, 1996; Garnier y Bové, 2000) enfermedad que es considerada más devastadora que la tristeza de los cítricos (da Graca, 1991; Halbert, 1999; da Graca y Korsten, 2004). Además, el insecto al alimentarse de la planta es capaz de provocar defoliación y muerte de ramas; causar daños severos en los puntos de crecimiento de las plantas (brotes), reducción en el tamaño de la fruta, desarrollo asimétrico, aborto de semilla y falta de jugo. Infestaciones altas de este insecto también originan abundantes secreciones de

mielecilla que favorece la presencia y desarrollo del hongo de la fumagina, la cual afecta el vigor de los árboles al interferir el proceso de la fotosíntesis (Halbert y Manjunath, 2004). Dentro del insecto, la bacteria cruza la pared intestinal hasta llegar a las glándulas salivales, vía hemolinfa, tomándose para esto de 1 a 3 semanas según la virulencia de la cepa (Orozco, 1995).

Los daños causados por *D. citri* se pueden clasificar en directos, producidos como resultado de las altas poblaciones de los psílidos, al alimentarse de la planta (Halbert y Manjunath, 2004) (Fig. 6), y daños indirectos cuando transmite la bacteria causante de la enfermedad denominada Huanglongbing (Mead, 2007).



**Figura 5.** Daño directo de *D. citri* en brotes de cítricos, causando defoliación, y muerte de ramas.

### **Plantas hospederas**

Existen numerosas observaciones acerca de los hospedantes preferenciales de *D. citri*. Algunos se mencionan en la norma oficial mexicana de emergencia NOM-EM-047-FITO-2009.

<i>Citrus amblycarpa</i> Ochse	Mandarino
<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	Limón Mexicano
<i>Citrus latifolia</i> Tanaka	Limón Persa
<i>Citrus aurantium</i> L.	Naranja Agrio
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Naranja Dulce
<i>Citrus x paradisi</i> Macfad.	Toronjo
<i>Murraya paniculata</i>	Limonaria, Mirto o Jazmín de la India

## Huanglongbing

Huanglongbing es una enfermedad bacteriana que provoca cuantiosas pérdidas en el cultivo de los cítricos a nivel mundial en la actualidad. Es causada por tres especies de  $\alpha$ - Proteobacterias, Gram negativas, exclusivas del floema, pertenecientes al género *Candidatus* (*Ca.*) *Liberibacter* (L.): *Ca. L. africanus*, sensible al calor (20-25 °C) y restringida a África (Bové, 2006); *Ca. L. asiaticus*, tolerante al calor ( $\leq 35^{\circ}\text{C}$ ) y ampliamente distribuida a nivel mundial (Asia, Oceanía y América) (Miyakawa, y Tsuno, 1989; Texeira *et al.*, 2005b; Bové, 2006) y *Ca. L. americanus*, sensible al calor ( $\leq 32^{\circ}\text{C}$ ) y presente sólo en Brasil (Texeira *et al.*, 2005a) y China (Lou *et al.*, 2008). La transmisión del HLB ocurre en la naturaleza a través de insectos psílidos: *Diaphorina citri* Kuwayama, para las formas americana y asiática de *Ca. Liberibacter* y *Trioza erytreae* Del Guercio, para la especie africana. También puede transmitirse experimentalmente a través de injerto y de la planta parásita *Cuscuta* sp. (Garnier y Bové, 1983, 1993; Duan *et al.*, 2008).

El Huanglongbing ha ocasionado la muerte de 23 millones de árboles de naranja y mandarina en Asia; 10 millones en África; 3 millones en Brasil y 450 mil árboles en los Estados Unidos (SENASICA, 2011). En México, el HLB fue detectado en 2009 en Yucatán, Quintana Roo, Jalisco, Nayarit, y en 2010 en los estados de Campeche, Colima y Sinaloa (SAGARPA, 2010).

## Síntomas del HLB

Durante la infección se muestran fuertes floraciones con un pobre cuajado de frutos; se presenta la caída prematura de frutos y los que se mantienen en el árbol son pequeños y asimétricos; también toman la coloración normal solo en la parte expuesta al sol, mientras que la otra parte toma una coloración verde-olivo intenso (Gottwald *et al.*, 2007) (Fig. 7).



**Figura 6.** Síntomas de HLB observados en plantaciones cítricas A: hojas con el síntoma de moteado asimétrico difuso; B: brotes cloróticos; C: Hojas con el síntoma de deficiencias de Zn; D: fruto de naranja con semillas abortadas y de color marrón pedúnculo hundido y nervios amarillos; E: fruto de naranja deformado con la columela torcida; F: hoja con nervios corchosos; G: hoja con nervios amarillos.

### Diagnóstico del HLB

Recientemente, ha sido informado el cultivo *in vitro* de las especies de *Ca. Liberibacter* (Scheler *et al.*, 2009), pero aún no se han establecido metodologías de diagnóstico basadas en este procedimiento. La microscopía electrónica (ME) fue la primera técnica utilizada para la confirmación y diagnóstico del huanglongbing (LafLèche y Bové, 1970) Uno de los métodos de diagnóstico indirectos utilizados es el marcaje con yodo del almidón que se acumula en cantidades anormales en los cloroplastos del parénquima en empalizada de las hojas afectadas (Schneider, 1968; Taba *et al.*, 2006). La observación de los gránulos de almidón teñidos con yodo de color púrpura o negro, a través del microscopio óptico, ha sido factible para el diagnóstico de la enfermedad (Onuki *et al.*, 2002).

Uno de los principales sistemas de diagnóstico de HLB a través de la PCR utilizados actualmente, está basado en la amplificación de la región 16S del ADN ribosomal de la bacteria mediante los cebadores OI1/OI2c/OA1 que permiten la

amplificación de un fragmento de 1160 pares de bases (pb) de las especies asiática y africana. Para diferenciar ambas especies, se lleva a cabo la digestión del producto de amplificación, con la enzima *Xba I*, obteniéndose un perfil de restricción de tres fragmentos (520 pb, 506 pb y 130 pb) para la especie africana y dos fragmentos (640 pb y 520 pb) para la forma asiática (Jagoueix, *et al.*, 1996). Por otro lado, a partir de la comparación de las secuencias del operón *rplKAJL-rpoBC* de las especies *Ca. L. asiaticus* y *Ca. L. africanus*, se diseñó el par de cebadores *rplA2/rplJ5*, los cuales permiten distinguir simultáneamente ambas especies, 703 pb para *Ca. L. asiaticus* y 669 pb para *Ca. L. africanus*, basándose en que existe una diferencia de 34 nucleótidos entre ambas especies en la región intergénica *rplA* y *rplJ* (Hocquellet *et al.*, 1999).

### **Métodos de control del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri***

Diversos métodos y estrategias de control se emplean para enfrentar, tanto el vector como la enfermedad. Se menciona que el manejo de esta enfermedad estará basado en el control del insecto vector, la eliminación de fuentes de inóculo por medio de la erradicación de los árboles enfermos y el establecimiento de anillos fitosanitarios alrededor de dichos árboles (Chiou, 1998).

### **Control químico**

En Brasil, los insecticidas que han ejercido un buen control sobre el psílido asiático de los cítricos son productos sistémicos en períodos de lluvia y de movimiento de savia como son el Aldicarb y el Imidacloprid (Childers y Rogers 2005). Otro insecticida comúnmente utilizado contra insectos chupadores es el dimetoato, el cual se ha empleado en huertos con baja tasa de infestación de *D. citri*. Es un producto utilizado desde hace algunos años en México., inhibe la acción de la acetilcolinesterasa (IRAC, 2009).

Algunos insecticidas químicos y aceites derivados de petróleo han sido evaluados contra PAC con resultados alentadores (Childers y Rogers, 2005; Dahiya *et al.*, 1994). Los aceites derivados de petróleo han demostrado control efectivo de las ninfas de *D. citri* en condiciones de campo (Rae *et al.*, 1997). Se han mencionado diversas opiniones sobre el modo de acción. Sin embargo, Stadler y Buteller (2009) indicaron que es más probable que penetre a través de poros en el integumento y el volumen de penetración dependerá de dos factores: la especie de insecto y el tipo de aceite. Una investigación reciente realizada por Najjar *et al.*, (2008), pone en entredicho la teoría de anoxia al demostrar que el modo de acción del aceite mineral se asocia con sus propiedades lipofílicas.

### **Control biológico**

Existe una diversidad de enemigos naturales que se alimentan sobre *D. citri*, tales como arácnidos, crisópidos, sírfidos y coccinélidos, destacándose este último grupo entre los depredadores más eficaces.

### **Parasitoides**

El género *Tamarixia* (Hymenoptera: Eulophidae) se reportó por primera vez en Tamaulipas, atacando a *D. citri* en hojas de lima mexicana (Coronado *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2004). La especie *T. radiata* posee la habilidad de adaptarse a diferentes condiciones y debido a ello se ha utilizado exitosamente en programas de control biológico del psílido en otras partes del mundo (Aubert *et al.*, 1980; Etienne *et al.*, 2001; Chien *et al.*, 1989).

### **Depredadores**

*Olla v-nigrum* (Coleóptera: Coccinellidae) *Hippodamia convergens*, (Coleóptera: Coccinellidae), *Cycloneda sanguinea* (Coleóptera: Coccinellidae), *Brachiacantha decora* (Coleóptera: Coccinellidae), *Harmonia axyridis* (Coleóptera:

Coccinellidae), *Chilocorus cacti* (Coleoptera: Coccinellidae), *Exochomus cubensis* (Coleoptera: Coccinellidae), *Scymnus distinctus* (Coleoptera: Coccinellidae), *Curinus* sp (Coleoptera: Coccinellidae), *Chrysoperla* sp (Neuportera: Chrysopidae) y *Ceraeochrysa* sp (Neuportera: Chrysopidae) (Martínez-Carrillo y Cortez-Mondaca, 2008).

### Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son importantes agentes de control biológico de insectos y frecuentemente ocasionan epizootias que reducen significativamente sus poblaciones (MaCoy *et al.*, 1988). Se conocen más de 100 géneros y 700 especies, pero poco más de 10 han sido empleadas en el control biológico de insectos. Entre los más importantes se destacan *Beauveria*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Entomophthora*, *Aschersonia*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Isaria* y *Lecanicillium* (López y Hans, 2001; Hajeck y St. Leger, 1994) siendo estos los de mayor importancia en el control biológico por la susceptibilidad en los insectos plaga y por su fácil multiplicación (Monzón, 2001). En observaciones realizadas durante el período Septiembre-Octubre 2009 por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Buenavista, Saltillo, Coah. México (UAAAN), se encontraron adultos de *Diaphorina citri* en la región de Gómez Farías, Tamaulipas, México (con cercanía al río) infecciones por *H. citrifomis* mayores al 90 % con humedad relativa entre el 70 y 80 %. Entre las especies de hongos entomopatógenos que atacan al psílido asiático de los cítricos se encuentran: *Isaria fumosorosea* Wize (Samson, 1974; Meyer *et al.*, 2004; Casique-Valdés y Sánchez-Peña, 2010) (Fig. 7).



**Figura 7.** *Isaria fumosorosea* infectando a ninfa de *D. citri*

## **Condiciones adecuadas de hongos entomopatógenos**

Para que la manifestación epizootica de los hongos entomopatógenos tenga lugar, los factores bióticos y abióticos tienen una enorme influencia. Entre los factores abióticos que afectan la viabilidad y la persistencia de los hongos entomopatógenos en el campo se encuentran los rayos ultravioleta, la temperatura, la humedad relativa y los fungicidas. La susceptibilidad y la relación con los hospederos se relacionan con los nutrimentos presentes en los insectos, que son el medio para la propagación, dispersión y persistencia de los hongos. Las esporas de los entomopatógenos tienen requerimientos específicos de agua y temperatura, así como de otros factores ambientales que en conjunto funcionan como inductores para la activación de receptores presentes en el patógeno y que les permiten llevar a cabo el proceso infectivo sobre el hospedero (Hajek, 1997).

### ***Isaria fumosorosea* Wize. (*Paecilomyces fumosoroseus*)**

Las especies entomopatógenas de *Paecilomyces* fueron formalmente clasificados en los géneros *Isaria* y *Spicaria*. Hodge et al., (2005) discuten la nomenclatura y la historia del género de *Isaria*, y Gams et al., (2005) propuso el nombre *Isaria*. Este microorganismo es capaz de infectar a una gran variedad de insectos (Smith, 1993).

## Clasificación Taxonómica.

Reino-----Mycetae

División-----Amastigomicotina

Clase-----Deutermycetes

Subclase-----Hypomycetes

Orden-----Moniliales

Familia-----Moniliaceae

Géneros----- *Isaria*.

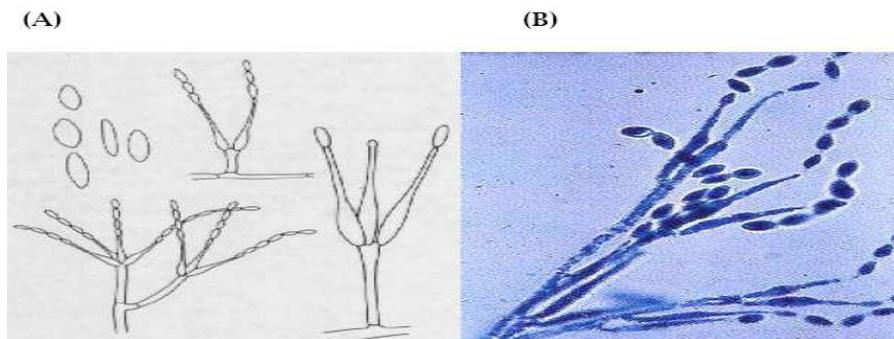
Especie -----*I. fumosorosea*.

(Según Alexopoulos y Mims 1979; McCoy *et al.*, 1988 y Samsom, 1988).

## Características de *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith

El género *Isaria* presenta hifas hialinas a amarillosas, septadas, de paredes delgadas. La mayoría presenta ramificaciones verticiladas o irregularmente ramificadas, llevan en su parte terminal en cada rama grupos de fiálides, las cuales pueden ser también solitarias. Las fiálides constan de una porción basal cilíndrica o hinchada, adelgazándose abruptamente a menudo para formar un cuello muy notorio (Figura 9 A). Los conidióforos llevan cadenas de conidias; éstas son hialinas, unicelulares y de forma ovoide (Figura 9 B) (Bustillo 2001).

Este hongo entomopatógeno se caracteriza por presentar colores vistosos como blanco, amarillo, verde pálido, rosa, rojo o púrpura. Presenta hifas hialinas a amarillentas, septadas y con paredes lisas. La estructura conidiógena es un sinema o nomosinema que consiste en hifas compactadas, conidióforos verticilados e irregulares con ramificaciones terminales, en donde, surgen racimos ensanchadas en forma de botella, con un cuello distintivo donde nacen las conidias las cuales crecen en cadena en forma basipétala por un célula, raramente dos, hialina o ligeramente pigmentada con paredes lisas o equinuladas o varias formas (Berlanga, 1997; Hernández, 1997; CB-06, 1999).



**Figura 8.** Características microscópicas y macroscópicas de *Isaria* spp. A. Esquema de conidióforos y conidias de *Isaria* spp. Dibujo tomado de Malloch (1997) B. Mico fotografía de conidióforos y conidias de *Isaria fumosorosea* Fotografía tomada de Herrera (2001).

### **Modo de Acción**

La espora del hongo, al ponerse en contacto con el insecto plaga, se le adhiere a la cutícula, penetrando directamente después de la germinación de la conidia, durante esta fase se forma el tubo germinativo y puede penetrar la cutícula o por medio de un apresorio y producción de enzimas como proteasas, lipasas y quitinasas. Al desarrollarse el hongo, libera toxinas contra el insecto, que provoca su muerte. *Isaria fumosorosea*, se adhiere al dorso del insecto, el tubo germinativo penetra y la hifa está presente en el homocelo del insecto 24 hrs después, (CB-06,1999; Agrobionsa, 1995; ECONOVA, 1998).

### **Espectro de acción**

Este entomopatógeno ha sido reportado infectando 41 especies de insectos de ocho órdenes, siendo plagas de importancia económica. *Isaria fumosorosea* es un patógeno de amplio espectro en huéspedes y ha sido aislado de insectos de diversas familias de los órdenes (Lepidóptera, Díptera, Coleóptera, Neuróptera, Himenóptera,

Thysanoptera, Hemíptera y Homóptera) en diferentes partes del mundo *I. fumosoroseus* se ha utilizado especialmente para el control de *Corposina sosakii* (Matsumuram) *Leptinotarsa decemlineata* (San), *Lymantria dispar*(L), *Galleria mellonella* (L), y termitas (Garza, 1992; CB - 06, 1999). Recientemente entre las especies de hongos entomopatógenos que atacan al psílido asiático de los cítricos se encuentran: *Isaria fumosorosea* Wize (Samson, 1974; Meyer *et al.*, 2004; Casique-Valdés y Sánchez-Peña, 2010).

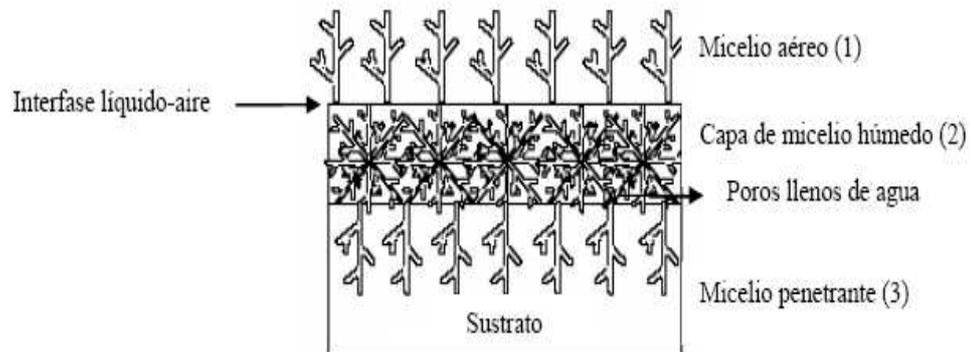
### **Medios de aislamiento de los hongos entomopatógenos**

Valenzuela (1987), menciona que un medio de cultivo debe contener una fuente de carbono, nitrógeno, sales inorgánicas, control de temperatura, pH, aireación, entre otros, sin descuidar dos aspectos esenciales: primero, que las condiciones óptimas para el desarrollo no necesariamente serán las mismas que para la esporulación, segundo, que el equilibrio óptimo de las condiciones físicas de desarrollo y componentes del medio están propensas al cambio.

Todos los medios de cultivo utilizados en micología deben contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo de los hongos (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc.). Algunos de los medios de cultivos son Sólidos o líquidos. El pH ha de ser 5.0 ligeramente ácido para facilitar el crecimiento de los hongos e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos. Además se deben añadir antibióticos antibacterianos para inhibir el crecimiento de las bacterias saprófitas que suelen contaminar las muestras. Los más usados son el cloranfenicol y la gentamicina.

En la mayor parte de los casos la producción masiva de hongos entomopatógenos se realiza por fermentación sólida (FS) (Fig. 9), la cual fue desarrollada desde hace varios siglos en los países orientales (Hölker y Lenz, 2005), donde hoy en día continúa siendo la técnica preferida para la producción de hongos entomopatógenos (Feng y col, 1994). Aunque en menor escala, la fermentación

líquida (FL) también es utilizada para la producción de unidades infectivas de hongos entomopatógenos, como las blastosporas o propágulos tipo conidios (Jackson y col, 1997; Issaly y col, 2005), sobre todo por la creciente presión de racionalización y estandarización de procesos y los problemas de escalamiento (Hölker y Lenz, 2005).



**Figura 9.** Esquema del crecimiento de hongos en FS (Modificado de Rahardjo y col, 2002).

Gómez-Carneiro (1992) utilizó la reproducción bifásica primero en medio líquido de arroz, después arroz estéril en bolsas de polipropileno con resultados muy favorables (citado por López, 1995).

Jackson *et al.*, 1997, trabajaron distintos medios de cultivo con diferentes concentraciones de carbono y relaciones de carbono: nitrógeno, para producir blastosporas de *Isaria fumosorosea* tolerantes a la desecación. Todos los medios probados soportaron la esporulación en cultivos sumergidos, incrementaron la concentración de blastosporas ( $5.8 \times 10^2$  esporas / mL) cuando se produjeron en medios conteniendo 80 g de glucosa y 13.2 g de casaminoácidos, y un alto por ciento (79 %) que sobreviven al secado al aire. El medio que contenía 20 g de glucosa y concentraciones de casaminoácidos de 13.2 a 40 g, presento un incremento en la producción de blastosporas tolerantes a desecación.

## **Formulación de hongos entomopatógenos**

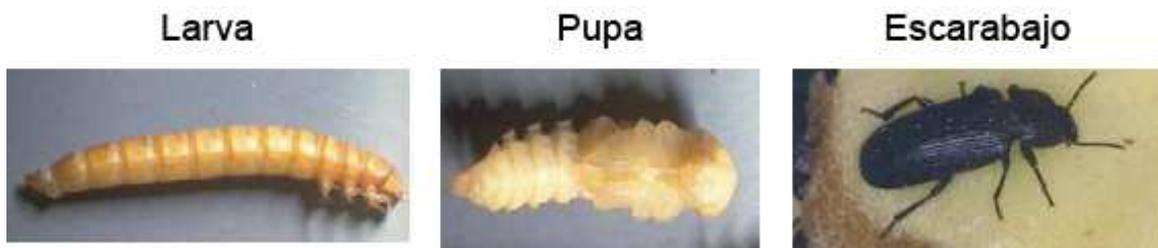
La formulación del hongo es el proceso mediante el cual el ingrediente activo, es decir las conidias del hongo, se mezclan con materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificantes y otros aditivos. Estos materiales inertes ayudan a que el hongo este más protegido al momento de la aplicación, así mismo, la facilita evitando que se sedimente fácilmente y/o que forme grumos que tapen la boquillas. Todo esto se hace con el fin de lograr una buena homogeneidad y distribución de las partículas del hongo, para poder ser manipuladas y aplicadas adecuadamente (Monzón 2001).

Hay dos tipos de formulaciones: 1. Seca o polvo mojable en la cual se utiliza un vehículo, el cual puede ser de origen mineral o vegetal, que ayuda a absorber la humedad de las conidias y mantiene la viabilidad por un tiempo considerable. 2. Líquida o emulsificable que utiliza un líquido solvente y un emulsificante. El líquido utilizado tiene la función de mantener suspendidas las conidias en el medio para lograr una mezcla homogénea que garantice una buena aplicación. Además este líquido debe evitar la absorción de agua por las conidias y mantener su viabilidad (Monzón, 2001).

## **Insectos de interés agrícola**

### ***Tenebrio molitor* (gusano de las harinas)**

El ciclo de vida del *T. molitor* toma alrededor de 6 meses. Se trata de un insecto hexápodo que pertenece al orden Coleóptera, suborden Polyphaga, la superfamilia Tenebrionoidea, la familia Tenebrionidae, el género *Tenebrio* y especie *T. molitor* (Gerber, 1975). En México es conocido bajo diferentes nombres: gusano de las harinas, gorgojo negro ó escarabajo molinero; en inglés se conoce como yellow mealworm (Fig. 11). En la naturaleza el *T. molitor* puede presentarse como plaga en los silos y molinos de granos (Montoya-Sansón y col., 2007).



**Figura 10.** Principales estadios de desarrollo *Tenebrio molitor*.

### ***Empoasca* sp. (chicharrita)**

Su ubicación taxonómica es del Orden: Hemiptera, Familia: Cicadellidae. La chicharrita ó saltamontes *Empoasca* sp. es considerada la plaga más importante del frijol en América Tropical. Se han reportado pérdidas en el rendimiento de 57 % sin utilizar ninguna protección química (Schoonhoven y Cardona, 1985). El daño, causado tanto por la ninfa como por el adulto, parece ser del orden físico, como consecuencia de la penetración de los estiletes en el floema de la planta lo cual ocasiona desorganización y granulación de los plastidios de las células y obstrucción de los haces vasculares; los síntomas que ocasionan son similares a los causados por algunos virus, se ha descartado que este insecto trasmita algún virus, el insecto inicia su ataque inmediatamente después de la emergencia de las plantas, lo primero que se aprecia es un curvado de las hojas hacia arriba y en otros casos hacia abajo, posteriormente las hojas presentan enrollamiento y amarillamiento de los bordes, lo cual se puede observar en el follaje, algunas veces puede ocurrir un amarillamiento intenso de los bordes de las hojas en las cuales la planta presenta enanismo.

### ***Bemisia tabaci* (mosquita blanca)**

La mosquita blanca es un insecto del Orden: Hemiptera, Suborden: Sternorrhyncha de la Familia: Aleyrodidae (Byrney y Bellows, 1991). *Bemisia tabaci* es un hemiptero con piezas bucales chupadoras del tipo opistógona, con alas membranosas y con la característica común a todas las especies de mosquita blanca, de producir en todos los estados de desarrollo, excepto en huevecillo, ceras extracuticulares que cubren todo el cuerpo; su tamaño aproximado es de 1.5 mm (Pacheco, 1986).

La mosquita blanca afecta los cultivos agrícolas, no sólo por la transmisión de geminivirus sino por daños directos. Las pérdidas que ocasionó en el norte de México fueron de 20 millones de dólares en 1991 (Avilés, 1997). La alimentación de la savia por ninfas y adultos provoca la aparición de manchas cloróticas en la planta que al afectar su vitalidad provoca su muerte (Sifuentes, 1953). La excreción de gotas de mielecilla también es fuente de daño, ya que disminuyen la calidad del producto y son un medio de desarrollo para hongos que a su vez interfieren en la fotosíntesis de la planta (Duarte, 1992 y Vet *et al.*, 1980).

### ***Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (pulgón del maíz)**

Orden: Homóptera, Familia: Aphididae

El principal hospedero de este pulgón es el maíz. Hospederos alternativos son: cebada, judías verdes, cáñamo de Manila, el mijo, papaya, papa, arroz, calabaza y otras gramíneas, sorgo, tabaco, caña de azúcar y trigo. El áfido de la hoja de maíz es una distribución cosmopolita en los trópicos, subtrópicos y regiones templadas. También se ha reportado en Japón y el sur de Escandinavia. La tasa de desarrollo, el número de la progenie, y la longevidad de los adultos es una gran influencia en la temperatura, las especies de plantas hospederas y edad de la planta huésped. 86° F es la temperatura óptima para el aumento de la población de la cebada (El-Ibrashy *et al.*, 1972). A esta temperatura, la tasa de natalidad es mayor en las plantas de cebada inmaduros y más bajos en las plantas senescentes. Las ninfas producidas por hembra fue de 37 en las plantas jóvenes, de 41 plantas inmaduras en los más antiguos, las plantas maduras de 34 y 18 en las plantas senescentes. El-Ibrashy *et al.* (1972) Proporciona información detallada tabla de vida.

Hay diferencias en los números de ninfas producidas y la vida útil de hembras aladas y sin alas. En 77 ° F hembras sin alas produjo un promedio de 68 ninfas (rango= 57 - 77). Los pulgones alados produjeron un promedio de 49 ninfas (Adams y Drew, 1964).

## MATERIALES Y METODOS

### Localización

La presente investigación se llevo a cabo en el laboratorio y en la cámara bioclimática del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

La fase de aplicación en campo, se llevo a cabo en en el campo experimental Ixtacuaco del INIFAP ubicado en km. 4.5 carretera Martínez de la Torre -Tlapacoyan, Veracruz. Este campo está localizado a (20°02'30.79 "N, 97°05'55.41"W). El clima es tropical, húmedo con una media anual de temperatura y precipitación de 23.4 °C y 1840 mm, respectivamente.

### Obtención de la cepa

*Isaria fumosorosea* Wize. Cepa: IF8B19 (Hypocreales: Clavicipitaceae). Fue aislado de *Diaphorina citri*, colectado en naranjo en Gómez Farías, Tamaulipas, México (22 °59'33"N, 99° 8'34 .82"W).

### Medios de cultivo

Fueron preparados 4 medios de cultivo o métodos de producción de *I. fumosorosea*: agar papa dextrosa (PDA), producción en granos de arroz previamente esterilizado, medio líquido para obtener blastosporas, reportado por Jackson *et al.*, (1997) y producción en método bifásico.

### Producción de *Isaria fumosorosea* en papa dextrosa agar (PDA)

Este medio preparado en el laboratorio, se compone de 250 g de trozos de papa con cascaras, 20 g de dextrosa y 20 g de agar, todo esto para 500 mL de agua destilada. La papa fue hervida en 500 mL de agua. Por separado, en un matraz

erlenmeyer se disolvió el agar con agua destilada. Se filtró el caldo de papa con una gasa y se mezcló ambas preparaciones agregando la dextrosa. Y se esterilizó a 121 °C por 15 min. Luego de esterilizados, los medios a condición tibia fueron vertidos 20 mL en cajas petri, hasta agotar el material preparado. Al siguiente día se procedió a cultivar la cepa IF8B19 por estría con ayuda de un ansa bacteriológica. Después se sellaron las cajas con cinta y fueron expuestas a condiciones de una cámara bioclimática en la cual permanecieron a una temperatura de 23 °C y una humedad relativa de 70 %, por 6 días.

### **Producción de *Isaria fumosorosea* en granos de arroz**

Primero fue limpiado el arroz, y en una bolsa de polietileno de capacidad de 1 kg se pesó 200 g de arroz y se le agregó 100 mL de agua destilada, posteriormente se ataron. El total de muestras son 5, de 200 g cada uno, y fue esterilizado a 121 °C por 15 minutos en una olla de presión, después se sacaron las bolsas con el arroz precocida y fue suspendido un número no determinado de esporas de la cepa IF8B19 en 10 mL de agua destilada, de la suspensión obtenida se tomo 5 mL con una jeringa esterilizada y se inyectó cada una de las bolsas que posteriormente el orificio se cubrió con cinta masking tape. Se mezcló el grano en las bolsas para lograr una mayor uniformidad de dispersión de esporas y las bolsas fueron expuestas a condiciones favorables en una cámara bioclimática donde permanecieron a una temperatura de 23 °C y una humedad relativa de 70 %, por 8 días.

### **Producción de blastosporas de *Isaria fumosorosea***

En 600 mL de agua destilada se añadió 1 % peptona, 0,5 % de extracto de levadura, 1 % de glucosa, 0,3 % de extracto de malta, posteriormente esterilizados a 121 °C por 15 min en olla de presión; después de enfriado el medio, se inoculó con la ayuda de una asa bacteriológica esporas obtenidas de la cepa IF8B19, después se llevaron los matraces para la producción de biomasa a un Orbit 1000 shaker,

(Labnet International, Inc., Edison, NJ). con agitación durante 4 días a temperatura ambiente a 150 rpm.

### **Producción de *Isaria fumosorosea* por método bifásico**

Fue colocado 60 mL de caldo con biomasa obtenida de la producción de blastosporas antes mencionadas (filamentos y levaduras de blastosporas de *I. fumosorosea*) en platos de Polystyrene de aproximadamente 30 cm x 18 cm, dejando una capa delgada para promover la producción de esporas aéreas. Las bandejas se incubaron durante 8 días en cámara bioclimática con 70 % de humedad relativa, después al secarse a los 8 días fueron cosechadas por raspado con una espátula y cubreobjetos. Las esporas cosechadas fueron incubadas en bolsas a 3 °C.

### **Técnicas analíticas**

#### **Conteo de esporas**

El conteo se realizó con una cámara Neubauer bajo microscopio con una ampliación de 400 x, siguiendo la técnica descrita por Goettel e Inghish (1994).

#### **Viabilidad**

Se realizó cuantificando la germinación de 200 esporas en medio PDA, el criterio para tomar en cuenta una spora germinada es cuando se forma un tubo germinativo, largo como la mitad del diámetro de la spora. En este caso se cultivaron esporas obtenidas en diferentes medios de cultivo, con el fin de determinar su viabilidad.

### **Condición y descripción de los bioensayos efectuados con *Isaria fumosorosea***

Para *Bemisia tabaci* (mosquita blanca) se realizaron 5 tratamientos: con 10 ninfas de *Bemisia tabaci* por tratamiento, y cada tratamiento consta de 5 repeticiones incluyendo el testigo. Con *Empoasca* sp. (chicharrita) se realizaron 4 tratamientos: con 10 adultos de *Empoasca* sp. por tratamiento, con sus 5 repeticiones incluyendo el testigo. Y para *Rhopalosiphum maidis* (pulgón del maíz) se realizaron 5 tratamientos: con 10 pulgones adultos por tratamiento que consta de 5 repeticiones incluyendo el testigo.

Referente al bioensayo realizado con *Tenebrio molitor* (gusano de las harinas) se prosiguió a realizar 10 tratamientos: con 4 larvas por tratamiento con 5 repeticiones incluyendo el testigo.

Y para el bioensayo realizado con *Diaphorina citri* en laboratorio se prosiguió a realizar 8 tratamientos: con 10 adultos por repetición, y cada tratamiento consta de 5 repeticiones incluyendo el testigo.

Los materiales utilizados en los bioensayos son: recipientes de plástico de 500 mL, transparente con filtro en la tapa, el cual fue acondicionado con una esponja humedecida con agua purificada que cubría la base del recipiente. Y se colocaron hojas de planta como alimento (obtenida en la recolecta de los insectos). Los recipientes con los bioensayos se mantuvieron a una temperatura de 25 °C, con humedad relativa de 70 % y 12 horas luz. Las formulaciones con esporas de *I. fumosorosea*, se midieron en cantidad de esporas / mL, y los medios de formulación en laboratorio fueron aceite comestible 1-2-3, y Tween20.

**Bioensayo 1. Infección de *Bemisia tabaci* (mosquita blanca) por diferentes concentraciones de blastosporas de *I. fumosorosea* formulados en Tween20.**

Para llevar a cabo este bioensayo fueron recolectados ninfas de *B. tabaci* en cultivos de girasol, ubicado en el bajío de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Este campo está localizado a 25° 23' N, 101° 00' W con altitud de 1743 msnm. Las formulaciones constan de Tween20 al 0.025 % a una concentración de blastosporas de  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  contadas en una cámara Neubauer (con esto se determino la concentración de blastosporas filtrando el caldo obtenido del medio de cultivo liquido) (Cuadro 1).

La metodología consistió en sumergir hojas de girasol que contenían 10 ninfas de mosquitas por tratamiento por 3 segundos, en la suspensión de blastosporas correspondientes, previamente someterlos a las condiciones de bioensayo mencionados anteriormente. El testigo sólo se sometió a Tween20. Posteriormente se llevo la lectura de mortalidad por infección obtenida en 10 días, y para asegurar la mortalidad causada por el hongo, las ninfas fueron acondicionadas en cajas petri con algodón humedecido, con el fin de crear humedad para la esporulación de *I. fumosorosea*.

**Cuadro 1. Bioensayo con blastosporas de *I. fumosorosea* a diferentes concentraciones contra *Bemisia tabaci*. T20= Tween20**

Tratamiento	Formulación	Concentración esporas / mL	Forma de aplicación	Estado biológico de <i>B. tabaci</i>
T1		$1 \times 10^4$		
T2		$1 \times 10^5$		
T3	T20	$1 \times 10^6$	Inmersión	Ninfa 2
T4		$1 \times 10^7$		
Testigo	T20			

## **Bioensayo 2. Infección de *Empoasca* sp. (chicharrita) por diferentes concentraciones de blastosporas de *I. fumosorosea* formulado en Tween20.**

Fueron recolectados adultos de *Empoasca* sp. (chicharritas) en cultivos de frijol ubicados en la UAAAN. Se formulo Tween20 al 0.025 % con concentraciones de  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  blastosporas / mL (Cuadro 2).

La metodología consistió en inactivar por 4 minutos a los adultos de *Empoasca* sp. (chicharritas) a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos en refrigeración, ya inmovilizadas, se prosiguió rápidamente a inocularlos con una formulación de Tween20 a diferentes concentraciones de *I. fumosorosea* esto con la ayuda de un pincel, después fueron colocadas en recipientes descritos anteriormente. El testigo solo se expuso a la formulación pero sin ninguna concentración de *I. fumosorosea*.

Las condiciones en las cuales se llevaron y se mantuvieron a cabo los bioensayos se describieron en el apartado anterior. Posteriormente se llevaron a cabo las lecturas de mortalidad por infección a los 10 días.

**Cuadro 2. Bioensayos con blastosporas de *I. fumosorosea* a diferentes concentraciones contra *Empoasca* sp. T20= Tween20**

<b>Tratamiento</b>	<b>Formulación</b>	<b>Concentración esporas / mL</b>	<b>Forma de aplicación</b>	<b>Estado biológico de <i>E. sp.</i></b>
T1		$1 \times 10^5$		
T2		$1 \times 10^6$		
T3	T20	$1 \times 10^7$	Tópica	Adulto
Testigo				

**Bioensayo 3. Infección de *Rhopalosiphum maidis* (pulgón del maíz) por diferentes concentraciones de blastosporas de *Isaria fumosorosea* formulado en Tween20.**

Fueron recolectados adultos de *Rhopalosiphum maidis* en cultivos de Maíz ubicados en la UAAAN. Se formulo Tween20 al 0.025 % con una concentración de blastosporas de  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ .

La metodología consistió en inocular adultos de *R. maidis* a diferentes concentraciones sumergiendo su alimento, en este caso hojas de maíz. El testigo no se expuso a *I. fumosorosea*, solo se mantuvo en la formulación de los tratamientos. Las condiciones en las cuales se sometieron los bioensayos se describieron en el apartado anterior.

**Cuadro 3. Bioensayo con blastosporas de *I. fumosorosea* a diferentes concentraciones contra *Rhopalosiphum maidis*. T20=Tween20**

Tratamiento	Formulación	Concentración esporas / mL	Forma de aplicación	Estado biológico de <i>R. maidis</i>
T1	T20	$1 \times 10^4$	Inmersión de alimento	Adulto
T2		$1 \times 10^5$		
T3		$1 \times 10^6$		
T4		$1 \times 10^7$		
Testigo				

**Bioensayo 4. Infección de *Tenebrio molitor* por diferentes formulaciones de *Isaria fumosorosea*.**

Los tenebrios fueron obtenidos de una cría establecida en el Departamento de Parasitología de la UAAAN. Las formulaciones fueron realizadas con aceite 1 % a una concentración de  $1.5 \times 10^6$ ; talco 0.5 g a una concentración de  $1 \times 10^6$ ; tierra de diatomeas 0.3 g a una concentración de  $1.8 \times 10^6$ ; savia de nopal 1 % a una concentración de  $9 \times 10^7$ ; y Emulsión (Tween20 y Aceite comestible) 1 % a una concentración de  $7 \times 10^6$  esporas / mL.

La metodología consistió en la aplicación tópica con las formulaciones de *I. fumosorosea* descritas, con la ayuda de un pincel, posteriormente expuestas a condiciones antes descritas. Las lecturas de mortalidad por infección fueron tomadas a los 10 días.

**Cuadro 4. Bioensayo de *I. fumosorosea* a diferentes formulaciones contra *Tenebrio molitor*.**

Tratamiento	Formulación	Concentración de la formulación	Concentración esporas / mL	Aplicación
T1	Aceite	1 %	$1.5 \times 10^6$	Tópica
T2	Emulsión	0.025 %	$1 \times 10^6$	
T3 Testigo	Aceite	1 %		
T4 Testigo	Emulsión	0.025 %		
T5	Talco	2.5 %	$9 \times 10^7$	
T6	Tierra de diatomeas	1.5 %	$7 \times 10^6$	
T7	Savia de nopal	1 %	$1.8 \times 10^6$	
T8 Testigo	Talco	2.5 %		
T9 Testigo	Tierra de diatomeas	1.5 %		
T10 Testigo	Savia de nopal	1 %		

**Bioensayo 5. Infección de *Diaphorina citri* en laboratorio por *Isaria fumosorosea* a diferentes formulaciones.**

Los adultos de *D. citri* insectos fueron colectadas en diferentes localidades como en los Municipios de Gómez Farías, Tamaulipas y en General Terán, Nuevo León. Para el tratamiento 1 y 2 la formulación es con Tween20 al 0.025 % a  $1 \times 10^8$  esporas / mL en la cual las esporas provienen de medio PDA, y con los tratamientos 3, 5 y 7 se usó formulaciones con aceite al 0.1 % a  $1 \times 10^8$  esporas / mL.

La metodología consistió en inactivar por un minuto los adultos de de *D. citri* con Bióxido de carbono, ya inmobilizadas fueron inoculados con la ayuda de un pincel, aplicando la formulacion en los tarsos de cada insecto, posteriormente puestas en recipiente. Las condiciones en las cuales se llevaron y se mantuvieron a cabo los bioensayos se describieron en los bioensayos mencionados con anterioridad. Posteriormente se llevo las lecturas de la mortalidad por infección durante 10 días, y para asegurar la mortalidad, las larvas son llevadas a cámaras húmedas.

**Cuadro 5. Bioensayos evaluados en laboratorio de *I. fumosorosea* contra *Diaphorina citri*.**

Tratamiento	Formulación	Origen de esporas	Concentración esporas / mL	Forma de aplicación
T1	T20	PDA	$1 \times 10^8$	Tarsos
T2	Aceite	PDA	$1 \times 10^8$	
T3 Testigo	T20			
T4 Testigo	Aceite			
T5	Aceite	Arroz	$1 \times 10^8$	
T6	Aceite	Blastosporas	$1 \times 10^8$	
T7 Testigo	Aceite			
T8 Testigo	Aceite			

## **Infección en campo de *Diaphorina citri* por *Isaria fumosorosea* a diferentes formulaciones y condiciones de incubación.**

La concentración para la aplicación en campo fue de  $6 \times 10^7$  esporas / mL con viabilidad de un 89 %, formulados con agua y Tween20 al 0,025 % (Aswini *et al.*, 2007) y una suspensión con emulsión de aceite mineral Purespray agrícola al 0.5 % más agua la suspensión se mezcló y ajustó a un volumen final de 10 litros con agua purificada. Las suspensiones se aplicaron inmediatamente después de hacer las formulaciones.

Las formulaciones se aplicaron en un campo de limón persa, en la cual no se le ha aplicado ningún manejo químico. La temperatura promedio va de 32 °C (11 de abril de 2011) a 37 °C (18 de abril 2011). La humedad relativa media osciló entre 55 % (11 de abril de 2011) al 70 % (18 de abril). Cada tratamiento incluyó 10 repeticiones (un árbol al azar designado), los árboles son de 2-2.5 m de altura, plantadas a 2 m de distancia en fila en hileras de 2-3 m de distancia, por lo que se le asignó un diseño completamente al azar, en la cual cada formulación consistió en 10 litros.

Para los tratamientos que difieren en número de aplicaciones (1 ó 2), de los 10 árboles tratados fueron divididos a cinco árboles por lo cual la contra parte se rociaron dos veces con un intervalo de las 24 horas. La aplicación realizada fue con un pulverizador de mochila con motor de gasolina (STIHL SR-420) (2,6 kW de potencia, el desplazamiento de  $56,5 \text{ cm}^3$ , peso: 11.1kg). La recolección de muestras de campo se llevó a cabo a las 72 horas después de la primera aplicación y 48 horas después de la segunda aplicación. La forma de obtener los resultados fue cortando 10 a 15 brotes al azar por árbol, y se colocaron en bolsas de plástico (Ziploc), las bolsas con los brotes fueron transportados al laboratorio y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 días y la otra mitad de bolsas con brotes (5) fueron colocados en hieleras con hielo para su transporte al laboratorio durante 20 horas, y posteriormente colocado en el refrigerador a una temperatura de 4 °C, en este

procedimiento se analizo la interacción de ninfas con *I. fumosorosea* con su efectividad en infección después de someterlos a temperaturas bajas, y a su vez frenar el desarrollo del hongo y su capacidad infectiva, después las ninfas en bolsas de plástico fueron trasladados a una cámara húmeda a 25 °C durante 48 horas. Las lecturas de mortalidad por infección consistieron en contar el número total de ninfas recogidas por árbol, basándose en la esporulación del hongo observada bajo el estereoscopio.

**Cuadro 6. Infección en campo de *Isaria fumosorosea* contra *Diaphorina citri*.**

Tratamiento	Formulación	Concentración esporas / mL	Incubación	No. De Aplicaciones
T1	T20	$5.6 \times 10^7$	25-32 °C	1
T2	T20	$5.6 \times 10^7$	25-32 °C	2
T3	T20	$5.6 \times 10^7$	4 °C	1
T4	T20	$5.6 \times 10^7$	4 °C	2
T5	Control		25-32 °C	1
	Absoluto			
T6	Control		25-32 °C	2
	Absoluto			
T7	Control		4 °C	1
	Absoluto			
T8	Control		4 °C	2
	Absoluto			
T9	EM	$5.6 \times 10^7$	25-32 °C	1
T10	EM	$5.6 \times 10^7$	25-32 °C	2
T11	EM	$5.6 \times 10^7$	4 °C	1
T12	EM	$5.6 \times 10^7$	4 °C	2
T13	Control EM		25-32 °C	1
T14	Control EM		25-32 °C	2
T15	Control EM		4 °C	1
T16	Control EM		4 °C	2

### Diseño Experimental

Se realizo un diseño al azar con igual número de repeticiones, las cuales se indican en cada bioensayo.

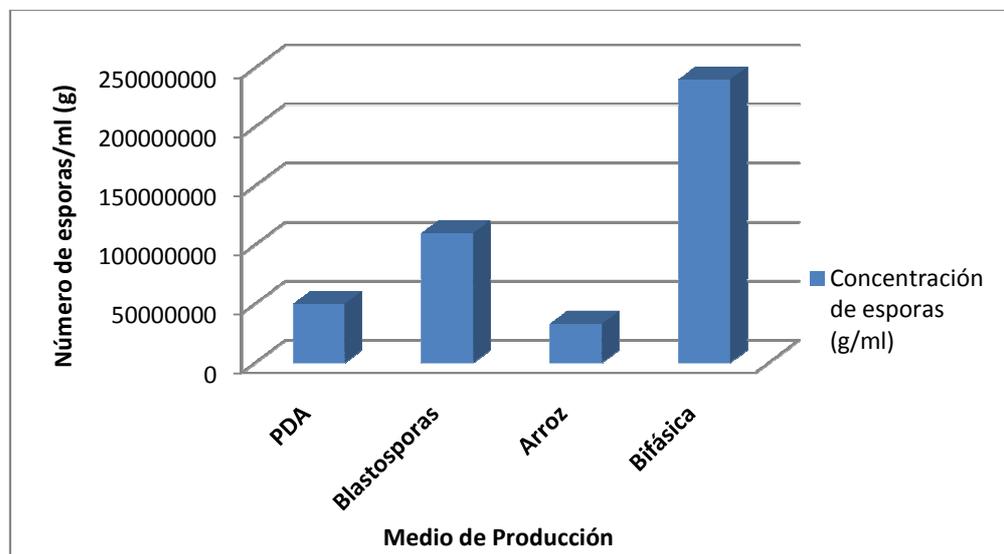
## **Análisis de datos**

Se efectuó mediante Análisis de Varianza (ANOVA) y comparación de medias (prueba de Tukey) con el programa de diseños experimentales FAUANL. Versión 2.5. Facultad de Agronomía UANL.

## RESULTADOS

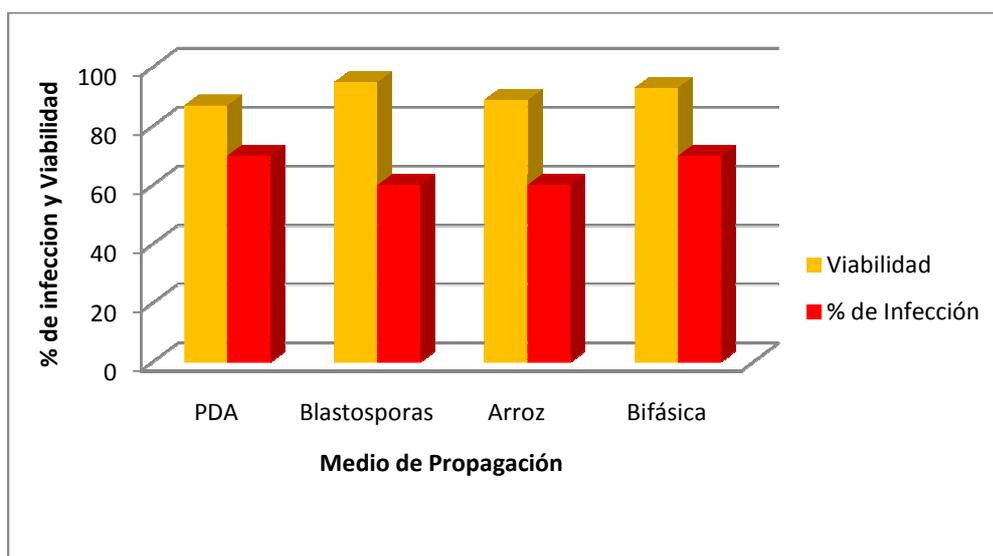
### Producción de *I. fumosorosea* en diferentes medios de cultivo: PDA, Arroz, medio de cultivo líquido (Blastosporas) y producción bifásica.

Para la producción por diferente medio de cultivo de la cepa IF8B19 *I. fumosorosea* los resultados en base a concentración de esporas son los siguientes: PDA generó una concentración de  $5 \times 10^7$  esporas / mL; el medio líquido para obtener blastosporas produjo una concentración de  $1.1 \times 10^8$  blastosporas / mL. En la producción de esporas en arroz los resultados de concentración fueron de  $3.3 \times 10^7$  esporas / g y por último en la concentración del medio de cultivo bifásico, los resultados finales alcanzaron la concentración de  $2.4 \times 10^8$  esporas / g (Fig. 11). Estos resultados son importantes para la producción de esporas y blastosporas en menor tiempo y en mayor concentración para llevar a cabo algunas pruebas y bioensayos requeridos.



**Figura 11.** Concentración de esporas de *I. fumosorosea* en diferentes medios de cultivo.

También se evaluó porcentaje de viabilidad y al final se estableció el porcentaje de infección obtenida en base a los bioensayos realizados con *D. citri* en laboratorio (Fig. 12). En esta grafica se observa variación entre la viabilidad y el porcentaje de infección de *D. citri* en laboratorio; esta pequeña variación pudo ser generada por las condiciones de laboratorio y de las diferentes formulaciones realizadas. Para la producción en PDA la viabilidad máxima es de 87 % y 70 % de infección, en la producción de blastosporas la viabilidad máxima alcanzó un 95 % con 60 % de infección, para las esporas obtenidas de arroz la viabilidad es de 89 % y 70 % de infección, por último en la producción por cultivo bifásico la máxima viabilidad fue de 93 % con 70% de infección. Estos datos son el promedio de germinación medida en PDA a 24 hrs de haber sembrado en dicho cultivo, la infección tiene como base la esporulación en *D. citri* para el bioensayo realizado en laboratorio.



**Figura 12.** Viabilidad e Infección de *I. fumosorosea* producida en diferentes medios.

**Bioensayo 1. Infección con blastosporas de *Isaria fumosorosea* a diferentes concentraciones contra *Bemisia tabaci* (mosquita blanca).**

En el cuadro 7, el análisis de varianza es altamente significativa ( $p < 0.0001$ ). El coeficiente de variación indica heterogeneidad en los tratamientos; existió un rango amplio en el promedio de mortalidad.

**Cuadro 7. Análisis de varianza de la variable mortalidad de *Bemisia tabaci* a los 10 días.**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Trat	4	13659.19	3414.79	21.84	0.000
Error	20	3126.80	156.34		
Total	24	16786.00			
C.V =	31.42 %				

Las concentraciones empleadas se comportaron estadísticamente diferentes obteniendo resultados de 78 % de mortalidad por infección, para el tratamiento 4 de concentración de  $1 \times 10^7$  esporas / mL. Los tratamientos que se asimilaron en mortalidad por infección son el tratamiento 3 y 2 con  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  esporas / mL de 33 % y 20 % de mortalidad por infección (Cuadro 8).

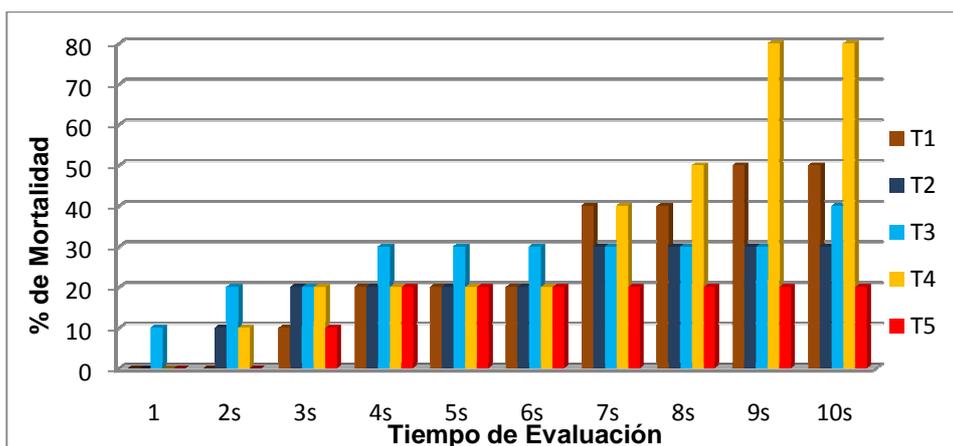
**Cuadro 8. Comparación de medias de la variable mortalidad de *Bemisia tabaci* a los 10 días.**

Tratamientos	Medias (%)	Grupos
4	78.40	A
1	52.80	B
3	33.00	C
2	20.80	CD
5	14.00	D

NIVEL DE  
SIGNIFICANCIA=0.05

T1=  $1 \times 10^4$ , T2=  $1 \times 10^5$ , T3=  $1 \times 10^6$ , T4=  $1 \times 10^7$ , T5= Testigo Absoluto

En la Figura 13. La mortalidad por infección más alta es del tratamiento 4 con la concentración de  $1 \times 10^7$  esporas / mL alcanzando el 80 %; sin embargo el testigo 5 de formulación Tween20 al 0.025 % la mortalidad es de 20 %; estos tratamientos fueron evaluados a los 10 días de haber realizado la aplicación por inmersión de las ninfas de *B. tabaci*. El tratamiento 1 produjo la infección más baja con 48.25 % de mortalidad.



T1=  $1 \times 10^4$ , T2=  $1 \times 10^5$ , T3=  $1 \times 10^6$ , T4=  $1 \times 10^7$ , T5= Testigo Absoluto.

**Figura 13. Mortalidad de *Bemisia tabaci* por la formulación Tween20 e *I. fumosorosea*.**

**Bioensayo 2. Infección por blastosporas de *Isaria fumosorosea* a diferentes concentraciones contra *Empoasca* sp. (chicharrita).**

Las concentraciones empleadas se comportaron estadísticamente diferentes obteniendo resultados del 88 % de mortalidad por infección, para el tratamiento 3 con  $1 \times 10^7$  esporas / mL, siendo la concentración más alta, los tratamientos 1 y 2 a concentraciones de  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  esporas / mL, generaron similitud en resultados de 69.60 % y 71.20 % de mortalidad por infección. (Cuadros 9 y 10).

**Cuadro 9. Análisis de varianza de la variable, mortalidad de *Empoasca* sp. a los 10 días después de la aplicación.**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>
Trat	3	5336.09	1778.69	4.22	0.012
Error	36	15165.68	421.26		
Total	39	20501.78			
C.V =	28.74 %				

**Cuadro 10. Comparación de medias de la variable mortalidad de *Empoasca* sp. a los 10 días.**

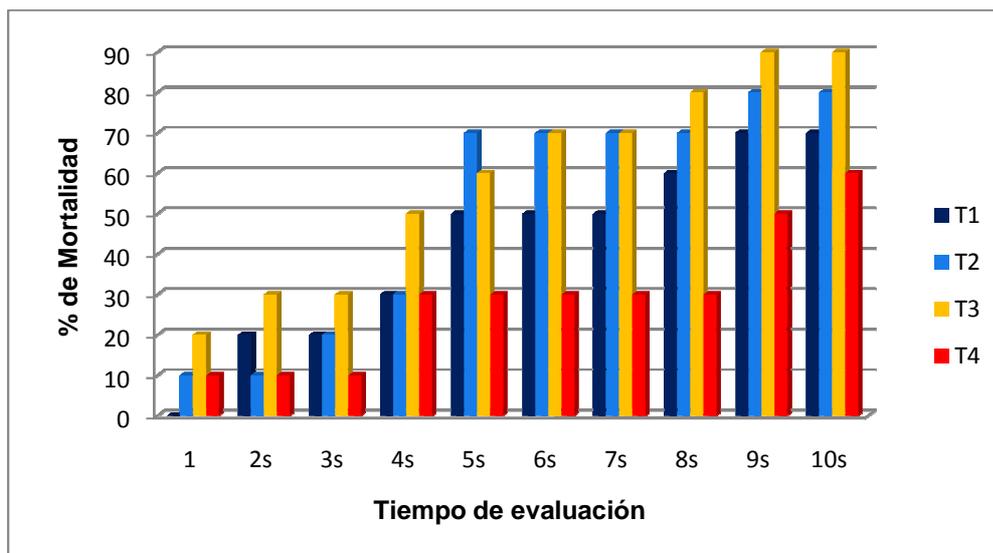
<b>Tratamientos</b>	<b>Medias (%)</b>	<b>Grupos</b>
3	88.70	A
2	71.20	AB
1	69.60	B
4	56.20	B

NIVEL DE SIGNIFICANCIA=0.05

T1=  $1 \times 10^5$ , T2=  $1 \times 10^6$ , T3=  $1 \times 10^7$ , T5= Testigo Absoluto

Observando la Figura 14, el tratamiento 3 con una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas / mL fue la más alta en mortalidad por infección con un 88.70 %; sin

embargo, el testigo empleado Tween20 al 0.025 % obtuvo un 56.2 % de mortalidad, estos tratamientos fueron evaluados a los 10 días de haber realizado la aplicación tópica. El tratamiento 1 con la concentración de  $1 \times 10^5$  fue la de menor infección con 69.60 %, esto posiblemente se deba a la baja concentración de esporas.



T1=  $1 \times 10^5$ , T2=  $1 \times 10^6$ , T3=  $1 \times 10^7$ , T4= Testigo Absoluto.

**Figura 14.** Mortalidad de *Empoasca* sp. por la formulación de Tween20 e *I. fumosorosea*.

**Bioensayo 3. Infección por blastosporas de *I. fumosorosea* a diferentes concentraciones contra *Rhopalosiphum maidis* (pulgón del maíz).**

Las concentraciones empleadas se comportaron estadísticamente diferentes obteniendo resultados del 78 % de mortalidad por infección para el tratamiento 4 con una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas / mL, los tratamientos 1 y 3 de concentración  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^6$  esporas / mL generaron mortalidad similar de 64 % y 62 % (Cuadros 11 y 12).

**Cuadro 11. Análisis de varianza de la variable mortalidad de *Rhopalosiphum maidis* a los 10 días.**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Trat	4	4576.00	1144.00	4.267	0.012
Error	20	5360.00	268.00		
Total	24	9936.00			
C.V =	28.03 %				

**Cuadro 12. Comparación de medias de la variable mortalidad de *Rhopalosiphum maidis* a los 8 días.**

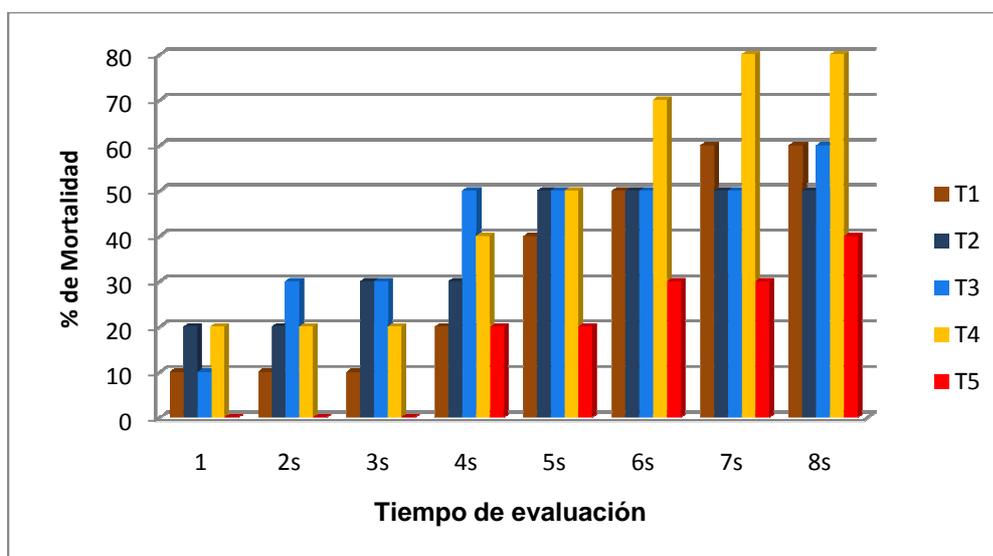
Tratamientos	Medias (%)	Grupos
4	78.00	A
1	64.00	AB
3	62.00	AB
2	50.00	BC
5	38.00	C

NIVEL DE

SIGNIFICANCIA=0.05

T1=  $1 \times 10^4$ , T2=  $1 \times 10^5$ , T3=  $1 \times 10^6$ , T4=  $1 \times 10^7$ , T5= Testigo Absoluto.

La mortalidad más alta se observó en el tratamiento 4 con una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas / mL con un 78 % de mortalidad por infección, superando éste al testigo empleado Tween20 al 0.025 % con 38 % de mortalidad; estos tratamientos fueron evaluados a los 8 días de haber realizado la aplicación sumergiendo el alimento de *R. maidis* (Figura 15). El tratamiento 1 fue el más bajo con la concentración de  $1 \times 10^4$  esporas / mL que generó una mortalidad del 64 %.



T1=  $1 \times 10^4$ , T2=  $1 \times 10^5$ , T3=  $1 \times 10^6$ , T4=  $1 \times 10^7$ , T5= Testigo Absoluto

**Figura 15.** Mortalidad de *Rhopalosiphum maidis* por la formulación de Tween20 e *I. fumosorosea*.

**Bioensayo 4. Infección por esporas de *Isaria fumosorosea* a diferentes formulaciones contra *Tenebrio molitor*.**

Las concentraciones empleadas se comportaron estadísticamente diferentes obteniendo resultados del 100 % para el tratamiento 2 con la formulación en emulsión a una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas / mL; los tratamientos 10, 6 y 2 fueron similares en mortalidad y son los que fueron formulados como testigo emulsión, tierra de diatomeas y testigo aceite (Cuadro 13 y 14).

**Cuadro 13. Análisis de varianza de la variable, mortalidad de *Tenebrio molitor* a diferentes formulaciones.**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Trat	9	40765.62	4529.51	18.50	0.000
Error	30	7343.75	244.79		
Total	39	48109.37			
C.V =	61.06 %				

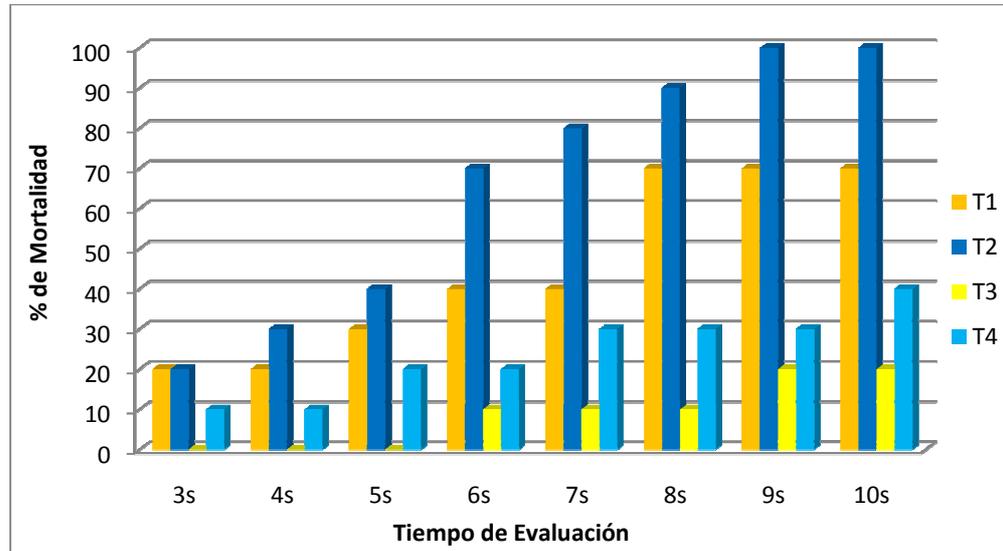
**Cuadro 14. Comparación de medias de la variable mortalidad de *Tenebrio molitor* a los 10 días.**

Tratamientos	Medias (%)	Grupos
2	100.0	A
1	68.75	B
4	31.25	C
3	25.00	CD
5	18.75	CDE
7	6.25	DE
8	6.25	DE
6	0.00	E
9	0.00	E
10	0.00	E

NIVEL DE SIGNIFICANCIA=0.05

**T1=** Formulación Aceite **T2=** Formulación Emulsión, **T3=** Testigo Aceite, **T4=** Testigo Emulsión, **T5=** Formulación Talco, **T6=** Formulación Tierra de diatomeas, **T7=** Formulación Savia de nopal, **T8=** Testigo Talco, **T9=** Testigo Tierra de diatomeas, **T10=** Testigo Savia de nopal.

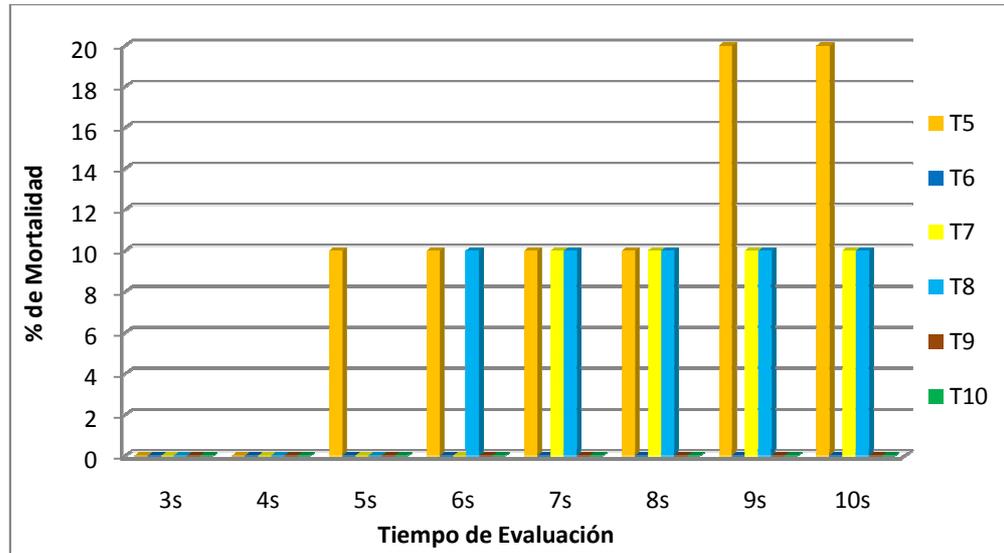
El tratamiento 1 con la formulación aceite 100 % y el tratamiento 2 con formulación emulsión, fueron las de mayor infección, con un 70 % y 100 % de mortalidad por infección, respectivamente (Figura 16). Esto podría deberse a que las esporas de *I. fumosorosea* se mantiene viables durante más tiempo e interactúa mejor por la forma en que el aceite hace una adhesión de esporas en la cutícula de la larva de *T. molitor*. En lo referente a los testigos, los cuales son: tratamiento 3 aceite formulado al 100 % y el tratamiento 4 emulsión, los resultados de mortalidad son de 20 y 40 %, respectivamente; es posible que las formulaciones afectaron la cutícula obstruyendo los espiráculos de la larva evitando su respiración.



T1= Formulación aceite al  $5 \times 10^6$ , T2= Formulación emulsión  $1 \times 10^6$  T3= Testigo aceite, T4= Testigo emulsión.

**Figura 16.** Infección de *Tenebrio molitor* por la formulación de *I. fumosorosea* aceite y emulsión.

Para los demás formulaciones, la mayor mortalidad por infección resultó el tratamiento 5 formulado con talco, alcanzando una máxima de 20 % de mortalidad (Figura 17). Estos bioensayos se realizaron con la finalidad de encontrar una mejor formulación en base a la interacción de las esporas de *I. fumosorosea* con el medio de producción para obtener una mayor mortalidad por infección; sin embargo, los resultados para el tratamiento 6 formulado con tierra de diatomeas es de 0 % de mortalidad, y para la formulación savia de nopal fue de 10 %, resultados muy bajos de mortalidad por infección, cabe mencionar que las mudas de las larvas de *T. molitor* pudieron influir en los resultados, debido a que las esporas son desechadas por la cutícula.



**T5**= Formulación talco  $9 \times 10^7$  **T6**= Formulación tierra de diatomeas  $7 \times 10^6$ , **T7**= Formulación Savia de nopal  $1.8 \times 10^6$ , **T8**= Testigo talco, **T9**= Testigo tierra de diatomeas, **T10**= Testigo savia de nopal.

**Figura 17.** Mortalidad de *Tenebrio molitor* por la formulación de *I. fumosorosea* en talco, tierra de diatomeas y savia de nopal.

**Bioensayo 5. Infección en laboratorio de *I. fumosorosea* contra *Diaphorina citri*.**

Las formulaciones empleadas se comportaron estadísticamente diferentes, la mayor mortalidad por infección fue de 82 %, representado por el tratamiento 5 a la concentración de  $1 \times 10^8$  esporas / mL formulado en aceite 0.1 %, las esporas de *I. fumosorosea* para este tratamiento se cosecharon de arroz (Cuadros 15 y 16).

**Cuadro 15. Análisis de varianza de la variable mortalidad de *Diaphorina citri* por diferentes formulaciones y formas de producción de *I. fumosorosea* después de 10 días de su aplicación.**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>
Trat	7	26177.50	3739.64	8.54	0.000
Error	32	14000.00	437.50		
Total	39	40177.50			
C.V =	45.72 %				

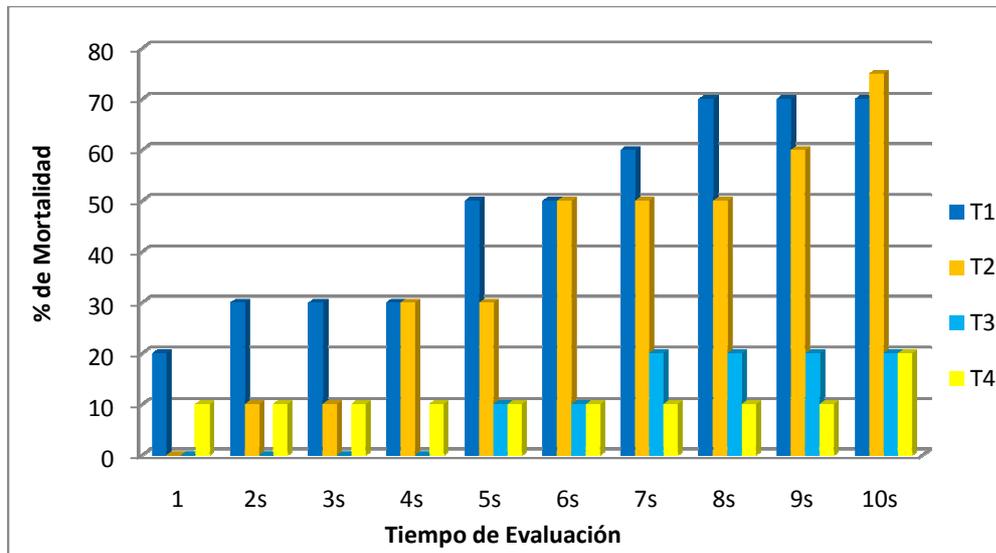
**Cuadro 16. Comparación de medias de la variable mortalidad de *Diaphorina citri* a los 10 días.**

Tratamientos	Medias (%)	Grupos
5	82.00	A
2	66.00	AB
1	62.00	AB
6	56.00	AB
7	54.00	B
8	26.00	C
4	18.00	C
3	2.00	C

NIVEL DE SIGNIFICANCIA=0.05

**T1**=Formulación Tween20 con esporas de PDA, **T2**= Formulación aceite con esporas de PDA, **T3**=Testigo Tween20, **T4**= Testigo aceites, **T5**=Formulación Aceite con esporas de arroz, **T6**= Formulación aceite con blastosporas, **T7**=Testigo aceite, **T8**= Testigo Aceite.

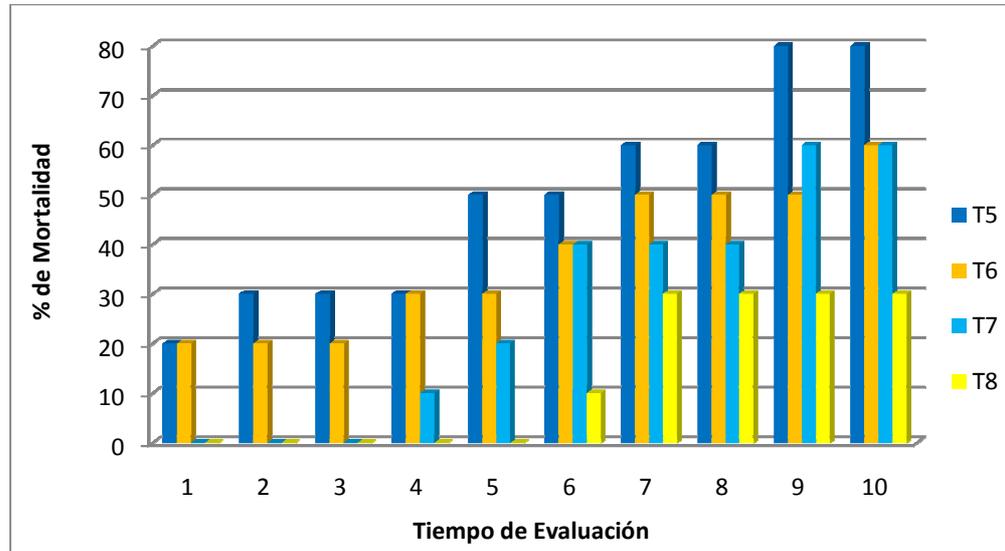
El tratamiento 1 de la Figura 18, formulado en Tween20 con esporas cosechadas de PDA-mostró un 62 % de mortalidad por infección; el tratamiento 2 en formulación aceite produjo un 66 % de mortalidad por infección; estos fueron evaluados a los 10 días después de la aplicación. En estos tratamientos la formulación en aceite presentó mayor mortalidad en base a la interacción de las esporas de *I. fumosorosea* con el aceite, manteniéndolas activas y con mas adhesión a la cutícula del insecto por más tiempo; en los testigos la mortalidad fue menor del 20 %.



T1=Formulación Tween20 con esporas de PDA, T2= Formulación aceite con esporas de PDA, T3= Testigo Tween20, T4= Testigo aceite.

**Figura 18.** Infección de *Diaphorina citri* por la formulación de esporas de *I. fumosorosea* en Tween20 y aceite.

En la Figura 19, el tratamiento 5 formulado en aceite con esporas cosechadas de arroz la mortalidad por infección es de 82 % a los 10 días, siendo el tratamiento con mayor infección para este bioensayo. El tratamiento 6 formulado en aceite y blastosporas de *I. fumosorosea* la mortalidad por infección es de 56 %, estos tratamiento son evaluados a los 10 días después de la aplicación tópica, las blastosporas produjeron menor infección en comparación con las esporas del arroz. Es posible que las blastosporas sean afectadas al momento de la formulación.



**T5=** Formulación aceite y esporas obtenidas de arroz, **T6=** Formulación aceite y blastosporas, **T7=** Testigo aceite, **T8=** Testigo aceite.

**Figura 19.** Infección de *Diaphorina citri* por la formulación de blastosporas y esporas de *I. fumosorosea* en aceite.

### **Infección en campo de *I. fumosorosea* contra *Diaphorina citri*.**

Las formulaciones empleadas se comportaron estadísticamente diferentes alcanzando resultados de mortalidad máxima de 67.60 % para el tratamiento 1 con una concentración de  $5.6 \times 10^7$  esporas / mL formulada con emulsión al 0.5 %, (Cuadros 17 y 18).

**Cuadro 17. Análisis de varianza de la variable, mortalidad de *Diaphorina citri* causada por la aplicación de *I. fumosorosea* en campo.**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>
Trat	15	51845.54	3456.36	20.62	0.00
Error	64	10725.20	167.58		
Total	79	62570.75			
C.V =	53.11 %				

**Cuadro 18. Comparación de medias de la variable mortalidad de *Diaphorina citri* en campo.**

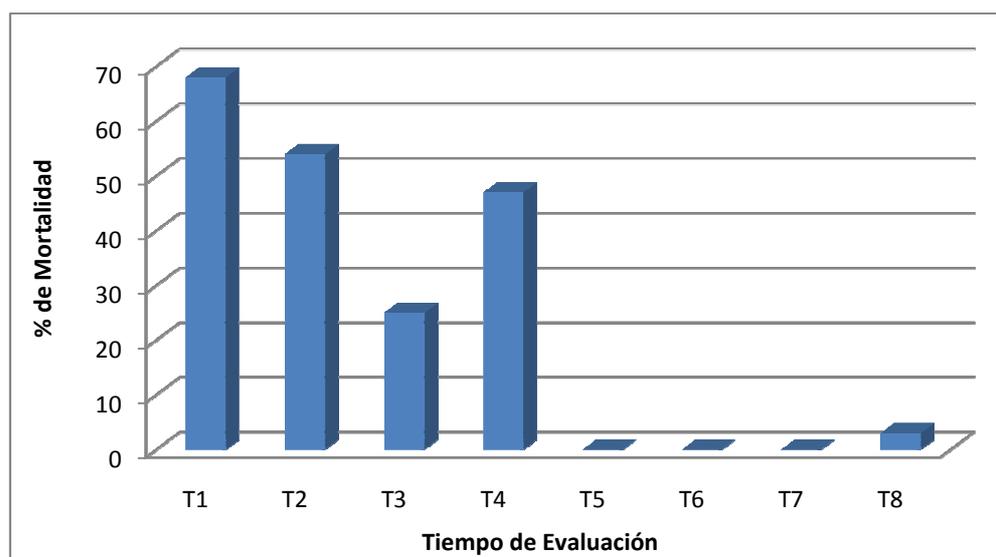
Tratamientos	Medias (%)	Grupos
1	67.60	A
11	60.80	A
12	50.60	B
4	47.00	BC
9	32.80	CD
10	31.00	CD
3	25.00	D
13	4.20	E
14	4.00	E
8	3.00	E
16	0.60	E
7	0.00	E
5	0.00	E
15	0.00	E
6	0.00	E

NIVEL DE SIGNIFICANCIA=0.05

**T1**=Formulación Tween20 (incubado a 25-32 °C), **T2**=Formulación Tween20 (2 aplicaciones incubado a 25-32 °C), **T3**=Formulación Tween20 (incubado a 4 °C), **T4**= Formulación Tween20 (2 aplicaciones incubado a 4 °C), **T5**=Control Tween20 (incubado a 25-32 °C), **T6**= Control Tween20 (2 aplicaciones incubado a 25-32 °C), **T7**= Control Tween20 (incubado a 4 °C), **T8**=Control Tween20 (2 aplicaciones incubado a 4 °C). **T9**= Formulación emulsión (incubado a 25-32 °C), **T10**= Formulación Emulsión (2 aplicaciones incubado a 25-32 °C), **T11**=Formulación emulsión (incubado a 4 °C), **T12**= Formulación emulsión (2 aplicaciones incubado a 4 °C)., **T13**= Control aceite (incubado a 25-32 °C), **T14**= Control aceite (2 aplicaciones incubado a 25-32 °C), **T15**= Control Aceite (incubado a 4 °C), **T16**= Control Emulsión (2 aplicaciones incubado a 4 °C).

Los siguientes tratamientos de la Figura 20 son formulados en Tween20, el tratamiento 1 incubado a 25-32 °C a 1 aplicación lo gro un 67.6 % de Infección, sin embargo el tratamiento 2 incubado a 25-32 °C a 2 aplicaciones mostró un 50.6 % de

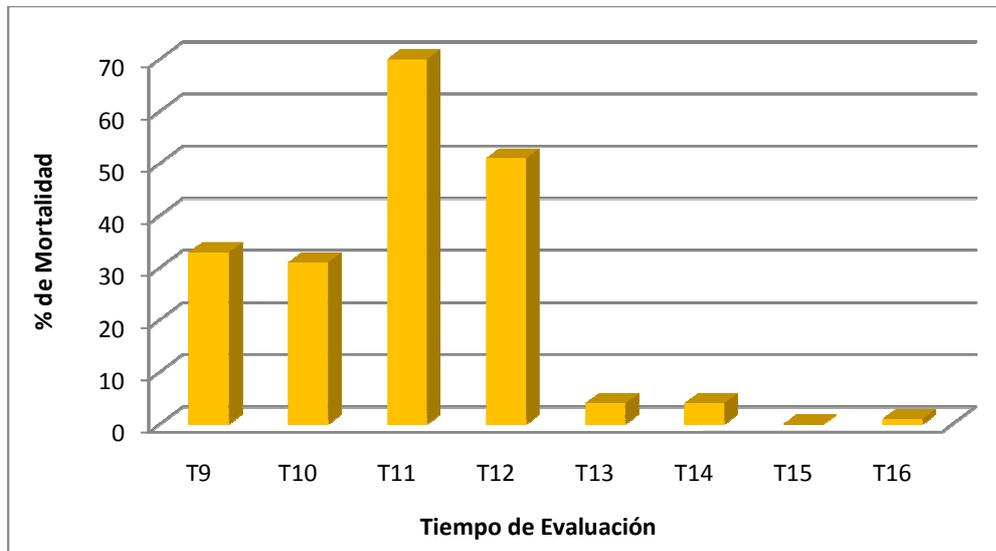
mortalidad, este resultado indica que con 1 aplicación puede obtenerse una mayor mortalidad por infección. Con referente a la incubación a 4 °C la mayor mortalidad por infección es en base a la aplicación 2 (tratamiento 4). El hongo entomopatógeno se mantuvo en latencia debido a la temperatura de 4 °C con la que se expuso.



**T1=** Formulación Tween20 (incubado a 25-32 °C), **T2=** Formulación Tween20 (2 aplicaciones incubado a 25-32 °C), **T3=** Formulación Tween20 (incubado a 4 °C), **T4=** Formulación Tween20 (2 aplicaciones incubado a 4 °C), **T5=** Control Tween20 (incubado a 25-32 °C), **T6=** Control Tween20 (2 aplicaciones incubado a 25-32 °C), **T7=** Control Tween20 (incubado a 4 °C), **T8=** Control Tween20 (2 aplicaciones incubado a 4 °C).

**Figura 20.** Infección en campo de *Diaphorina citri* por la formulación de *I. fumosorosea* y Tween20 de 1 a 2 aplicaciones con dos formas de incubación.

Con referente a las formulaciones realizadas con emulsión, el tratamiento 11 incubado a 4 °C a 1 aplicación causó un 60.8 % de mortalidad por infección, y el tratamiento 12 incubado a 4 °C a 2 aplicaciones, la mortalidad por infección alcanzó un 50.6 %. El tratamiento 10 incubado a 25-32 °C a 1 aplicación la mortalidad por infección logró 32.8 % siendo menor a comparación con la forma de incubación a 4 °C (Figura 21), en estos resultados la emulsión mantiene en mayor latencia a las esporas de *I. fumosorosea*.



**T9=** Formulación emulsión (incubado a 25-32 °C), **T10=** Formulación Emulsión (2 aplicaciones incubado a 25-32 °C), **T11=** Formulación emulsión (incubado a 4 °C), **T12=** Formulación emulsión (2 aplicaciones incubado a 4 °C), **T13=** Control aceite (incubado a 25-32 °C), **T14=** Control aceite (2 aplicaciones incubado a 25-32 °C), **T15=** Control Aceite (incubado a 4 °C), **T16=** Control Emulsión (2 aplicaciones incubado a 4 °C).

**Figura 21.** Infección en campo de *Diaphorina citri* por la formulación de *I. fumosorosea* en emulsión a 1 y 2 aplicaciones a 2 incubaciones.

## DISCUSIÓN

Con base a la producción de esporas de *I. fumosorosea* en diferentes medios de cultivo, el de mayor volumen de concentración fue para el método bifásico, siendo ésta la mejor forma de producir esporas y cosecharlas de una forma rápida y sencilla; esta eficiencia es debido a la baja concentración de medio líquido en la que se expone el hongo, razón por la que después de carecer de suficiente medio de alimentación el hongo forma esporas para su siguiente fase de desarrollo. Estos resultados concuerdan con una investigación realizada por Quintero-Zapata (1998), donde el medio de cultivo líquido alcanzo una concentración de  $1.95 \times 10^8$  esporas / mL. En las fermentaciones aerobias, la transferencia de oxígeno a los microorganismos es indudablemente el fenómeno más importante para mantener la actividad microbiana. Gómez-Carneiro, (1992) utilizó la reproducción bifásico, primero en medio líquida de arroz y después arroz estéril en bolsas de polipropileno con resultados muy favorables.

Con respecto a las pruebas de viabilidad y porcentaje de infección en la cual se garantiza la patogenicidad, las conidias de mayor viabilidad son las producidas por blastosporas, la explicación es debido a que las levaduras de las blastosporas crecen más rápido en medio de cultivo de PDA debido al cambio de alimentación de *I. fumosorosea*. El medio PDA es útil para realizar la evaluación del porcentaje de viabilidad, la cual es menor en este medio. El hongo al cultivarse en el mismo medio pierde algunas cualidades que lo determinan, generando un proceso de mutación. En lo referente a la viabilidad del hongo, las que mostraron el mayor porcentaje fueron aquellas cepas cultivadas en PDA a nivel laboratorio, y la de menor viabilidad son las blastosporas y el medio de producción en arroz.

En los primeros bioensayos realizados en insectos de importancia agrícola, en lo que se refiere a *B. tabaci* (mosquita blanca) la máxima infección alcanzó un 80 % con la concentración de  $1 \times 10^7$  esporas / mL debido a la aplicación en forma de

inmersión; algunas investigaciones como el de Chan-Cupul (2010) menciona haber obtenido el porcentaje de mortalidad de 74.5 %.

En los resultados de infección de chicharrita *Empoasca* sp., la máxima se alcanzó con una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas / mL. Este bioensayo alcanzó una mortalidad de 90 % en el transcurso de 10 días. Estos resultados son útiles y deberían ser considerados para realizar un plan de manejo de esta plaga.

Referente al bioensayo con *R. maidis* (pulgón del maíz), la infección máxima alcanzada fue de 80 % de mortalidad, debido a la presencia de conidias aplicadas en el follaje. Este insecto posee cuerpo blando que puede ser un factor de infección más rápida como la que se registró en el presente estudio. En *Tenebrio molitor* la mejor formulación fue a base de emulsión con 100 % de infección. Las esporas son más viables en esta formulación debido posiblemente a la mejor adherencia de esporas en la cutícula de la larva. Para el bioensayo de *D. citri* en laboratorio, la formulación en aceite fue la de mayor infección con un 80 %, estos resultados fueron similares a los obtenidos por Pasco *et al.*, (2009), quienes lograron una mortalidad de 95 % en adultos de *D. citri*.

Para la prueba efectuado en campo contra ninfas de *Diaphorina citri*, la formulación *I. fumosorosea* en emulsión en 1 aplicación fue la mejor con 70 % de infección; Tween20 a 1 aplicación también mostró resultados sobresalientes con infección de 68 %. Las aplicaciones realizadas en una sola vez son más efectivas que las de 2 aplicaciones. Esto es un dato muy importante para una menor inversión para el control del vector del HLB, en la región de Martínez de la Torre, Veracruz.

El control biológico siempre ha existido, lo que se busca es encontrar el equilibrio entre los enemigos naturales contra los insectos que generan pérdidas, esto se debe considerar debido a que los enemigos naturales no generan resistencia, son selectivos para cada insecto, y puede llegar a tener el mismo control que con cualquier otro producto insecticida convencional.

## LITERATURA CITADA.

- Adams, J. B. and M. E. Drew. 1964. Grain Aphids in Brunswick. II. Comparative Development in the Greenhouse of Three Aphid Species on Four Kinds of Grasses. *Can. J. Zool.* 42: 741-744.
- Agrobionsa, 1995. Alternativas de control biológico para el productor amigo del medio ambiente. Boletín técnico. Agrobiológicos del Noreste, S. A. de C. V., Culiacán, Sinaloa, México.
- Albert, Susan y Manjunath, K. (2004): Asian Citrus Psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Fla. Entomol.* 87(3): 330-353.
- Alexopoulos, C. J. y C. W. Mins. 1979. *Introductory Micology*. 3ª Ed. John Wiley and Sons Nueva York.
- Álvarez, F. J., Montes de Oca, N. F., y Grillo, R. H. 1994. Hongos entomopatógenos de *Diaphorina citri* Kirk. (Homoptera;Psillidae) en Jovellanos, Matanzas. p.12.
- Atwal, A.S.; Chaudhary J.P. y Ramzan, M. (1968): Studies on the development and field population of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama (Psyllidae: Homoptera). *J. Res. Punjab Agric. Univ.* 7: 333 338.
- Aubert B., J.M. Bove & J. Ettiene. 1980. La lutte contre lamadie du greening des agrumes á l'île de la Réunion. Resultats et perspectives. *Fruits* 35: 605-624.
- Aubert, B. 1987. *Trioza erythrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. *Fruits* 42:149-162.
- Avilés, G. M. 1997. Distribución vertical de mosquita blanca *Bemisia tabaci* Gen (*Homoptera: Aleyrodidae*) en tomate. *Tesis de maestro en ciencias*.

Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Agronomía. Culiacán Rosales, Sinaloa. 140 p.

Beattie, G.A. y Smith, D. (1993): *Citrus leafminer*, Agfact H2.AE.4. 2nd edition (NSW Agriculture), pp. 6.

Berlanga, P.A. M<sup>a</sup>. 1997. Aislamiento, identificación y conservación de hongos entomopatógenos. Memoria del II Curso Taller de Producción de Agentes de Control Biológico. Tecoman, Colima. Pp. 18-30.

Bove J. M. 2006. Huanglongbing a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. J. Plant Pathol. 88: 7-37.

BUSTILLO, A. 2001. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de entomología. Bogotá. pg. 30-53.

Byrne, N. D. y Bellows T. S. Jr. 1991. Whitefly biology. Annu. Rev. Entomol. 36:431-457.

Casique, V.R., Sánchez, P.S.R. 2010. Entomopathogenic fungi attacking the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in the Gulf citrus zone of Mexico. 58th Annual Meeting of the Southwestern Branch, Entomol. Soc. Am., SW-ESA, Cancun, Mexico.

Catling, H. D. 1970. Distribution of the psyllid vectors of citrus greening disease with notes on the biology and bionomics of *Diaphorina citri*. FAO Plant Protection Bulletin, 18:8-15.

CB- 06. 1999. Ficha técnica Paecilomyces spp. Enemigo natural de Mosquitas blancas. CNRCB. SAGAR, México.

Cermeli, M., P. Morales, and F. Godoy. 2000. Presencia del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en Venezuela. Boletín Entomología Venezolana 15: 235-243.

- Chan C. W., Ruiz S. E., Cristobal A. J., Perez G. A., Munguia R. R., Lara R. J., (2010) Desarrollo en vitro de cuatro cepas nativas de *Paecilomyces fumosoroseus* y su patogenicidad en estados inmaduros de mosquita blanca. Agrociencia. <http://www.slideshare.net/cokiemonster/patogenicidad-de-paecilomices-fumosoroseus-isaria-fumosorosea-en-mosquita-blanca-bemisia-tabaci>
- Chien, C.C., Chiu, S.C., Ku S.C. 1989. Biological control of *Diaphorina citri* in Taiwan. *Fruits* 44(7-8): 404-407.
- Childrens, C. C. and Rogers, E. M. 2005. Chemical control and management approaches of the Asian Citrus Psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera:Psilidae) in Florida Citrus. *Proc. Flo. State Hort. Soc.* 110:49-53.
- Chiou, N. C. (1998): Ecology of the insect vectors of citrus systemic diseases and their control in Taiwan. FFTC Publication Database. (En línea). Disponible en [www.agnet.org/library/eb/459a/](http://www.agnet.org/library/eb/459a/). (Consulta: 20-9-2007).
- Chiou-Nan Chen. 1998. Ecology of the Insect Vectors of Citrus Systemic Diseases and Their Control in Taiwan. FFTC Publication Database.
- Coronado B., J.M, E. Ruiz C., S. Nicolaevna M. & G. Gaona García. 2003. *Tamarixia* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoide del psílido asiático de los cítricos en Tamaulipas, México, pp. 71-73. En: Memorias del XXVI Congreso Nacional de Control. Biológico. Noviembre de 2003, Guadalajara, Jalisco, México.
- da Graca, J.V. 1991. Citrus greening disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 109-136.
- da Graca, J.V., and L. Korsten. 2004. Citrus huanglongbing: Review, present status and future strategies, p. 229-245. *In*: S.A.M.H. Naqvi (ed.) Diseases of fruits and vegetables, Vol. 1. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- Dahiya, K.K.; Lakra, R.K.; Dahiya, A.S. y Singh, S.P. (1994): Bioefficacy of some insecticides against citrus psylla, *Diaphorina citri*. *Crop Research Hisar.* 8 : 137-140.

- DGSV. Dirección General de Fomento a la Agricultura, 2007 Presencia del Huanglongbing en Florida, EE.UU. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (SENASICA Circular No. 15220 Septiembre 2005).
- Duarte R. Ma. A. 1992. Generalidades sobre mosquitas blancas en: Métodos de control de mosquita blanca en hortalizas. SARH, CP, CNRP, INIFAP, CRECIDATH-CP, CNRDF. Mexicali, Baja California, p. 4-5.
- Econova, 1998. Boletín técnico. ECOMAN. Plaguicida biológico. Servicios integrales para la agricultura orgánica. Xalapa, Ver, México.
- El-Ibrashy, M. T., S. El-Ziady and A. A. Riad. 1972. Laboratory Studies on the Biology on the Corn Leaf Aphid, *Rhopalosiphum maidis* (Homoptera: Aphididae). Entomol. Exp. Appl. 15(2): 166-174.
- EPPO. 2005. PQR database (version 4.4). Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization.
- EPPO/CABI. 1996. Citrus greening bacterium. In: Quarantine Pests for Europe Supplement 1993-1995. Wallingford, UK: CAB International.
- Etienne J, Quilici S, Marival D, Franck A. 2001. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera, Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera, Eulophidae). Fruits 56: 307-315. Ferron,
- Etienne, J; S. Quilici; D. Marival y A. Franck. 2000. Controle biologique de *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) a la Reunion et en Guadeloupe au moyen de *Tamarixia radiata* (Hym., Eulophidae) Atelier regional d'information sur la situation phytosanitaire des agrumes dans la Caraibe. Guadeloupe. 1-8 p.
- Feng M.G., Poprawski T.J., Khachatourians G.G. (1994) Production, formulation and application of the entomo-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*, 4: 3–34.

- Fernández, M y Miranda, I. 2005: Comportamiento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Parte I: Características morfológicas, incidencia y enemigos naturales asociados. *Rev. Protección Veg.* 20(1): 27-31.
- GAMS , W.; HODGE, K.T.; SAMSON, R.A.; KORF, R.P.; SEIFERT, K.A. Proposal to conserve the name *Isaria* Pers.: Fr. (anamorphic fungi) with a conserved type. *Taxon*: in press, 2005.
- Garnier, M., and J.M. Bové. 2000. Hunglongbing (Greening), p. 46-48. *In*: L.W. Timmer, S.M. Garnsey, and J.H. Graham (eds.) *Compendium of citrus diseases*. Second Edition. APS. Press. St. Paul, Minnesota.
- Gerber G. H. 1975. Reproductive behavior and physiology of *Tenebrio molitor* (Coleóptera: Tenebrionidae). *Can. Ent.* 107: 551-559.
- GOETTEL, M. S., AND G. INGLISH. 1994. Fungi: Hyphomycetes. Pp. 223-214. *In*: L. Lacely (Ed.). *Manual of Techniques in insect pathology*. Academic Press. pp. 409.
- Gottwald, T. R., da Graça, J. V., and Bassanezi, R. B. 2007. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2007-0906-01-RV.
- Grafton, C. E. E., Godfrey, K. E., Rogers, M. E., Childers, C. C. and Stansly, P. A. 2006. Asian Citrus Psyllid. University of California. Agriculture and Natural Resources. Publication 825. ANR Communication Services. Oakland, California.
- Hajek, A.E. Y St. Leger, R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*, 39: 293-322.
- Hajek AE (1997) Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Adv. Microb. Ecol.*15: 193-249.

- Halbert, S. and Manjunath K.L. 2004. Asian Citrus Psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and Greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87(3): 401-402.
- Halbert, S.E. 1999. Asian citrus psyllid- A serious exotic pest of Florida citrus. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, University of Florida. <http://doacs.state.fl.us/~pi/enpp/ento/dcitri.htm>.
- Halbert, S.E., and K.L. Manjunath. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87(3): 330-353.
- Hernández, V. M. P. y P. A. M. Berlanga. 1997. Susceptibilidad de ninfas de Congreso de Control Biológico. Pp. 88-90.
- HERRERA, J. Welcome to Herrera's Microfungi Home Page. [enlínea] División of Science. Truman State University. Kirksville. Abr2001. [citado marzo, 2003]. [http://www2.truman.edu/~jherrera/Anamorphic\\_fungi/genera..html](http://www2.truman.edu/~jherrera/Anamorphic_fungi/genera..html)
- Hocquellet A., Toorawa P., Bové J.M., Garnier M., 1999. Detection and identification of the two 'Candidatus Liberibacter' species associated with the citrus Huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the  $\beta$  operon. *Mol. Cell. Probes* 13: 373-379.
- HODGE, K.T.; GAMS, W.; SAMSON, R.A.; KORF, R.P.; SEIFERT, K.A. Lectotypification and status of *Isaria* Pers.: Fr. Taxon: in press , 2005.
- Hölker U., Lenz J. (2005) Solid-state fermentation-are there any biotechnological advantages?. *Current Opinion in Microbiology*, **8**: 301–306.
- Hung T. H., Wu M. L., Su H. J. 2000. Identification of alternative hosts of the fastidious bacterium causing citrus greening disease. *J. Phytopathol.* 48: 321–326.

- Hung, T.H.; Hung, S.C.; Chen, C.N.; Hsu, M.H. y Su, H.J. (2004): Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector–pathogen relationships. *Plant Pathology*. 53: 96-102.
- Husain, M.A. and D. Nath. 1927. The citrus psylla (*Diaphorina citri*, Kuw.) (Psyllidae: Homoptera). *Memoirs of the Department of Agriculture India* 10: 1-27.
- IRAC. 2009. Mode of action and classification. International Resistance Action Committee. Version 6.3. 14 p.
- Issaly N., Chauveau H., Aglevor F., Fargues J., Durand A. (2005) Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. *Process Biochemistry*, **40**: 1425–1431.
- Jackson M. A., McGuire M. R., Lacey L. A., Wraight S. P. (1997) Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycological Research*, **101**: 35–41.
- Jackson, M. A., McGuire, M. R.; Lacey, L. A. and S. P. Wraight. 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticide fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycological Research*. 95: 1-7.
- Jagoueix S., Bové J., Garnier M. 1996. Techniques for the specific detection of the two Huanglongbing (Greening) *Liberobacter* species: DNA/DNA hybridisation and Dna amplification by PCR. En: Proc. of 13th Conf. of the Intl. Org. of Citrus Virologists (IOCV), da Graça, J.V., Moreno, P., Yokomi, R.K. eds., Riverside, CA: 384-387.
- Lacey L. A., Fransen J. J., Carruthers R. (1996) Global distribution of naturally occurring fungi of *Bemisia*, their biologies and use as biological control agents.

- In: *Bemisia 1995: Taxonomy, Biology, Damage, and Management*. D. Gerling and R. Mayer, Eds. Intercept, Andover, pp. 401–433.
- Lafèche D., Bové J. M. 1970. Structures de type mycoplasme dans les feuilles d'orangers atteints de la maladie du greening. C. R. Acad. Sci. Ser. D 270:455-465.
- López L.V.; Hans Börje J. (2001) Biodiversidad del suelo: control biológico de nemátodos fitopatógenos por hongos nematófagos. Cuaderno de Biodiversidad 6: 12 – 15.
- López, M. C.: «*Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson: caracterización, reproducción y obtención de un biopreparado como efecto nematocida». Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, 1995.
- Ma Coy, C.W., Samson, R.A., Boucias, D.G., Microbial insecticides, Part A: Entomogenous protozoa and fungi. En: Ignoffo, C.M. y Mandava, N.B. (Eds.). Handbook of Natural Pesticides, Vol. 5. CRC Press, Boca Raton, FL, 1988. pp. 151-236.
- MALLOCH, D. MOULDS: Isolation, cultivation, identification. [en línea] Department of Botany, University of Toronto. 1997 [citado marzo, 2003]. <http://www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/Moulds.html>
- Martínez Carrillo, J.L. y Cortez Mondaca. 2008 El psilido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* amenaza la producción cítrica de México. Memoria del XI Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas. UABC. [HTTP://JLMC-ENTOMOLOGO.BLOGSPOT.COM/2010/04/DIAPHORINA-CITRI-KUWAYAMA.HTML](http://JLMC-ENTOMOLOGO.BLOGSPOT.COM/2010/04/DIAPHORINA-CITRI-KUWAYAMA.HTML).
- McCoy, R. A., Samson y D. G. Boucias. 1988. Entomogenous fungi. In: CRC Handbook of natural pesticides. V Microbial Insecticides. Part a

- entomopathogenous protozoa and fungi C. M. Ignoffo (Ed.). CRC, Press. Inc. Boca Raton, Fl. Pp. 151-236.
- Mead, F.W. 2007. Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Insecta: Homóptera: Psyllidae). University of Florida. IFAS Extensión. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN16000.pdf>.
- Meyer J. M., Hoy M. A., Boucias D. G. 2007. Morphological and molecular characterization of a *Hirsutella* species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology*. 95(2): 101-109.
- Miranda-Salcedo, M.A., López-Arroyo J.I. 2009. Ecología del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae) en Michoacán p.55. En: Memorias del XXXII Congreso Nacional de Control Biológico, Villahermosa, Tab., Méx.
- Montoya-Sansón E, Zavala-Ramirez M, Mier T, Hernandez-Velazquez V, Berlanga-Padilla A, Toriello C. 2007. Virulencia de diversos aislados de *Metarhizium anisopliae* en el modelo experimental de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). XXX Congreso Nacional de Control Biológico-Simposium del IOBC, Mérida, Yucatán.
- Monzon, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*. Costa Rica. (63): 95-103.
- Najar R. A. J., N. A. Lavidis, R. K. Mensah, P.T. Choy and G. H. Walter. 2008. The toxicological effects of petroleum spray oils on insects: Evidence for an alternative mode of action and possible new control options. *Food and Chemical toxicology* 46(9): 3001-3014.
- Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-047-FITO-2009. Diario Oficial de la federación miércoles 8 de julio de 2009.

- Onuki M., Ngoc N., Nesumi H., Thu L., Kobayhashi H. 2002. Useful Histological Method for Distinguishing Citrus Yellowing Leaves Infected With Huanglongbing From Those Caused by Other Factors. Development of New Technologies Practice for Sustainable Farming in the Mekong Delta- JIRCAS Workshop- Canto, Nov. 26-28.
- Orozco, S. S. 1995. Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México, Universidad Autónoma Chapingo, México. 150.
- Pacheco, M. F. 1986. Plagas de los cultivos agrícolas en Sonora y Baja California. SARH. Primera reimpresión. Sonora, México, p. 47.
- Pasco B. A., Wayne B. H., David G. H., Mark A. J., Charles A. P., Michael E. R., (2009). *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) Infection and dissemination of the entomopathogenic fungus *isaria fumosorosea* (hypocreales: cordycipitaceae) under laboratory conditions. Florida Entomologist 92(4) P 608.
- Quintero Zapata I. 1998. Producción de esporas de *Paecilomyces fumosoroseus* en diferentes medios de cultivo líquidos. Tesis de Maestro en ciencias. UANL
- Rae, D.J., Liang, W.G., Watson, D.M., Beattie, G.A. y Huang, M.D. 1997. Evaluation of petroleum spray oils for control of the Asian citrus psylla, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae), in China. *Intern. J. Pest Management*. 43(1): 71-75.
- Rahardjo Y., Weber F., le Comte E., Tramper J., Rinzema A. (2002) Contribution of aerial hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration in a model solid-state fermentation system. *Biotechnology and Bioengineering*, **78**: 539–544.
- Roistacher, C. N. 1991. Techniques for biological detection of specific citrus graft transmissible diseases, pp. 35-45. (Greening). FAO. Rome pp 286.
- Ruiz C., E., J.M. Coronado B. & S.N. Myartseva. 2004. The Asian citrus psyllid in Mexico. Annual Meeting of the Entomological Society of America. Salt Lake City, UT.

- SAGARPA. 2010. Medidas contra plaga del "Dragón Amarillo", Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. México, D.F. (SENASICA, Comunicado 355, Agosto de 2010).
- Samson, R. A . 1988. Identification: Entomopathogenic Deuteromycetes. Academic Pres. Cap. 6. Pp. 194-222.
- Samson, R.A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. Stud. Mycol. 6: 1-119.
- Sánchez, A.H; Robles, G.P. y Delgado, C.J. 2005. Programa Nacional de Certificación de Cítricos en México: Antecedentes, resultados y perspectivas. Memoria del Primer Simposio Internacional sobre Certificación de Cítricos y Quinto Congreso Nacional de Citricultores. Pereira, Colombia.
- Schneider H., 1968. Anatomy of greening-diseased sweet orange shoots. *Phytopathol.* 58: 1155-1160.
- SCHOGNHOVEN, A.; CARDONA, C. 1985. Plagas que atacan el follaje. *In* Frijol: investigación y producción. CIAT, Cali, Colombia. p. 263-278.
- Sechler A., Schuenzel E. L., Cooke P., Donnua S., Thaveechai N., Postnikova E., Stone A. L., Schneider W. L., Damsteegt V. D., Schaad N. W. 2009. Cultivation of „*Candidatus* Liberibacter asiaticus“, „*Ca. L. africanus*“, and „*Ca. L. americanus*“ associated with Huanglongbing. *Phytopathology* 99 (5): 480-486.
- SENASA (2006): *Diaphorina citri* Psilido Asiático de los Citrus. (En línea). Disponible en [http:// www.sinavimo.gov.ar/files/diaphorina\\_citri%20.pdf](http://www.sinavimo.gov.ar/files/diaphorina_citri%20.pdf). (Consulta 3-9-07).
- Sifuentes, A. J. A. 1953. Contribución al estudio de la biología y control de *Trialeurodes vaporariorum* West, en frijol. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior de Agricultura Antonio Narro. Coahuila. México.

- Smith, P. 1993. Increased infectivity of oil and emulsifiable oil formulations of *Paecilomyces fumosoroseus* conidia to *Bemisia tabaci*. Dep. Biology, Imperial College of Science, Silwood Park. p. 82.
- Stadler, T. and Buteller M. 2009. Modes of entry of petroleum distilled spray-oils into insects: a review. *Bulletin of Insectology* 62 (2): 169-177.
- Taba S., Nasu K., Takaesu K., Ooshiro T., Moromisato Z. 2006. Detection of Citrus Huanglongbing using an Iodo-starch reaction. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* 53: 19-24.
- Tang, L.C. y Su, T.H. (1984): Rearing method and developmental stages of the citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama. *Bull. Soc. Entomol.* (National Chungsing University, Taichung, Taiwan). 5(17): 27-33.
- Tripplehorn, C. A. y N. F. Johnson. 2005. Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects. Thomson Brooks/Cole, Belmont, California, USA.
- Tsai J.H., and Y.H. Liu. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. *J. Economic Entomology* 93(6):1721-1725.
- Valenzuela, L. E. 1987. Microorganismos entomopatógenos. Su aprovechamiento en el control de plagas. U.A.Ch. dirección general de patronato Universitario. Chapingo, Estado de México, México. 119 p.
- Wenninger, E. J. and D. G. Hall. 2007. Daily timing of any age at mating in the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Fla. Entomol.* 90: 715-722.
- Wenninger, E.J., D.G. Hall, and R. W. Mankin. 2009. Vibrational communication between the sexes in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Annals Entomol. Soc. America.* 102 (3): 547-555.
- Xu, C.-F., Y.-H. Xia, K.-B. Li, and C. Ke. 1988. Further study of the transmission of citrus huanglongbin by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, p. 243-248. *In: L.*

W. Timmer, S. M., and L. Navarro (eds.) Proc. 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, CA.