

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Efectividad del Hongo Entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin (cepa B6C), en el Control de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)

Por:

JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ CONTRERAS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Marzo 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Efectividad del Hongo Entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin
(cepa B6C), en el Control de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)

Por

JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ CONTRERAS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité de Asesoría:

Dr. Sergio René Sánchez Peña
Asesor Principal

Dr. José Isabel López Arroyo
Coasesor

Dr. Oswaldo García Martínez
Coasesor

Dr. Gabriel Gallegos Morales
Coordinador de División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México
Coordinación
División de Agronomía

Marzo 2016

AGRADECIMIENTOS

A Dios. Porque sin la gloria y gracia de Dios solo somos almas sin camino ni destino.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro “*Alma Terra Mater*”. La cual me brindo las herramientas, conocimientos y experiencias para formar parte en una sociedad y comprometerme con una de las más antiguas profesiones, Agricultor.

Al Dr. Sergio Rene Sánchez Peña. Profesor, amigo y asesor principal de este trabajo, muchas gracias por tanto apoyo.

Al Dr. José Isabel López Arroyo. Por su colaboración en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Dr. Eric Rebek. Por la oportunidad de realizar mi estancia profesional, el apoyo durante la misma y su amistad.

DEDICATORIA

A mis padres:

José Guadalupe Rodríguez Bermúdez

Y

Margarita Contreras Gaona

Por ser parte fundamental de mi vida, ejemplo de esfuerzo, lucha, perseverancia y solidaridad. A ellos quienes no se rinden ante los momentos difíciles en la vida. Gracias por enseñarme que con el compromiso, ganas y fe se puede lograr las metas de la vida.

A mis hermanos:

Gustavo y Sandra, a ellos que forman parte de mi vida, compartir sus experiencias y observar a través de ellos los bellos momentos de la vida. Con cariño para Perla Fernanda motivo de seguirme esforzando y dar lo mejor cada día.

Para mis amigos y compañeros:

Celso Morales Reyes, Fernando Sánchez Pedraza, Fredy Herrera Aguayo, Fabián Quintero Tovar, Israel Carrera Carrera, José Madrigal, Irvin de la Cruz, quienes fueron y son parte de esto, gracias por su ayuda, su apoyo y amistad durante todos estos años en la universidad.

Especialmente para: Ana Daniela García Hernández y Ana Margarita Hernández Sánchez, quienes me motivaron y apoyaron enormemente, muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
RESÚMEN	V
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
La enfermedad del Huanglongbing (HLB).....	4
Síntomas causados por el HLB.	5
Identificación y Diagnostico.	6
Importancia y daños en México.	7
El Psílido Asiático de los Cítricos <i>Diaphorina citri</i> kuwayama.....	7
Clasificación taxonómica.	8
Presencia del PAC en México.	8
Hospedantes.	9
Biología y características morfológicas de PAC.	10
Huevos.	11
Ninfas.	11
Adulto.	12
Síntomas de daño ocasionados por <i>Diaphorina citri</i>	13
Métodos de Muestreo.	13
Distribución de <i>Diaphorina citri</i> en el mundo.....	14
La distribución de <i>Diaphorina citri</i> en México.	14
Importancia Económica	14
Tipos de Control	15
Control químico de <i>Diaphorina citri</i>	15
Control biológico de <i>Diaphorina citri</i>	16

Descripción de hongo <i>Beauveria bassiana</i>	17
<i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin.	17
Clasificación taxonómica de <i>Beauveria bassiana</i>	18
Características del <i>Beauveria bassiana</i>	18
Incidencia Natural.	20
Modo de acción de hongos entomopatógenos.	20
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Localización.....	24
Bioensayo 1. Mortalidad inducida sobre <i>Diaphorina citri</i> en campo.....	24
Obtención de Cepas.....	24
Producción de <i>Beauveria bassiana</i> en un medio artificial (PDAL).....	25
Conteo de Esporas.....	26
Viabilidad de esporas.	26
Aplicación de <i>Beauveria bassiana</i> en campo.	26
Bioensayo 2. Confrontación de hongos entomopatógenos sobre medio artificial PDA.	28
Análisis de datos.....	30
RESULTADOS.....	31
Bioensayo 1. Mortalidad de <i>Diaphorina citri</i> en campo inducida por conidas de <i>Beauveria bassiana</i>	31
Esporulación sobre los psílicos.	33
Bioensayo 2. Confrontación de hongos entomopatógenos sobre medio artificial.	35
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIÓN	38
LITERATURA CITADA.....	39

ÍNDICE DE CUADRO

Cuadro 1. Plantas hospederas de <i>D. citri</i>	9
Cuadro 2. Tratamientos de hongos entomopatógenos sobre <i>Diaphorina citri</i> en prueba de campo.	28
Cuadro 3. Hongos entomopatógenos usados en la confrontación <i>in vitro</i>	28
Cuadro 4. Confrontaciones de <i>B. bassiana</i> con otros hongos entomopatógenos en laboratorio.	29
Cuadro 5. Medias de la mortalidad corregida (\pm error estándar), e intervalos de confianza al 95 % de los tratamientos contra <i>Diaphorina citri</i>	31
Cuadro 6. Análisis de varianza de los tratamientos patogénicos sobre <i>Diaphorina citri</i> en brotes de <i>Citrus sinensi</i> var. Valencia.....	32
Cuadro 7. Análisis de varianza de esporulación por los hongos entomopatógenos sobre el psílido asiático de los cítricos.	33
Cuadro 8. Analisis de varianza del crecimiento radial diario de <i>Beauveria bassiana</i> en interacción con <i>I. fumosorosea</i> y <i>M. brunneum</i> sobre medio PDA.....	35
Cuadro 9. Subconjuntos de los tratamientos en confrontación resultados de la prueba de Tukey (IC 95%).	36

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Síntomas ocasionados por HLB en hojas de cítricos. Fuente: SENASICA. 5
- Figura 2.** Distribución (en verde) de *Diaphorina citri* Kuwayama en México de acuerdo a SENASICA (2010). 9
- Figura 3.** Ciclo de vida de *Diaphorina citri* kuwayama (a). Vista Dorsal (b), vista lateral (c), de adulto de PAC. Fuente: Nathan Cottrell. Bugguide.net. 11
- Figura 4.** Ninfas de *Diaphorina citri* secretando “cera” distintiva. Fuente BOUVET, J. P. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA); Unidad Asociada de Entomología Agrícola UJI-IVIA: Centro de Protección Vegetal y Biotecnología.... 12
- Figura 5.** Adulto de *Diaphorina citri* kuwayama, presentando características distintivas. Fuente: Carlos E. G. Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario, Palmira, Valle. 13
- Figura 6.** *B. bassiana*: Estructuras conidiales agrupados (A), Fialides [células de los conidióforos con la base en forma de botella] (B), Conidios globosos a subglobosos (C). 19
- Figura 7.** Scarabeidae infectado de forma natural en bosque de Nueva Zelanda. Fuente: thehiddenforest.co.nz. 20
- Figura 8.** Ciclo infectivo de *Beauveria bassiana*. (A) Conidia se adhiere a su hospedero induciendo la germinación. 1. Producción del tubo germinativo. 2. Presión mecánica y secreción de enzimas para a travesar la cutícula. 3. Se activa la producción de blatosporas para colonizar el hemocele. 4. Las toxinas se alimenta de azúcares de la hemolinfa. 5. Las blatosporas segregan toxinas

provocando la muerte. (B) Una vez el hospedero muerto el hongo a traviesa la cutícula desde el interior y esporula sobre el cadáver. Las flechas indican la dirección del desarrollo fúngico. 22

Figura 9. Diagrama de posición de los explantes a confrontar, a una distancia de 2 cm entre los bordes de los discos. Las medidas fueron tomadas del centro del disco en dirección al otro..... 29

Figura 10. Comparación de medias de mortalidad corregida y barras de error estándar contra *Diaphorina citri* en campo con intervalo de confianza del 95%, letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos..... 32

Figura 11. Porcentajes de esporulación de *Beauveria bassiana* (27%), sobre insectos muertos del psílido asiático de los cítricos y el tratamiento combinado Mix: *Metarhizium brunneum* (0%), *Beaveria bassiana* (41%), *Isaria fumosorosea* (58%)..... 33

Figura 12. Porcentajes de esporulación en los tratamientos fúngicos sobre el psílido asiático de los cítricos (\pm EE), con un intervalo de confianza del 95%, Las letras diferentes sobres las barras indican diferencias significativas..... 34

Figura 13. Medias de crecimiento radial diario (\pm EE), por *Beauveria bassiana* y confrontaciones *in vitro*. Las letras similares indican que no hay diferencia significativa entre cada tratamiento, de acuerdo a la prueba de Tukey..... 36

Correo electronico; Jose Antonio Rodriguez Contreras, pepe_712_91@msn.com

RESÚMEN

La presente investigación está enfocada fundamentalmente en la evaluación del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilemin cepa B6C contra el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), el cual es el insecto vector de la enfermedad Huanglongbing. Adicionalmente, se estudió la interacción *in vitro* de *Beauveria bassiana* entre dos hongos entomopatógenos: *Metarhizium brunneum* cepa 6M11 e *Isaria fumosorosea* cepa IF8B19. Se evaluó *B. bassiana* en campo con una concentración de $1.3 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ y un tratamiento constituido por la mezcla de los hongos entomopatógenos antes mencionados, a una concentración de $1.4 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$, formulado con un surfactante (Bionex) a una concentración de 0.05% v/v. En la evaluación de la mortalidad de las ninfas se obtuvo un porcentaje de mortalidad para *B. bassiana* del 40%, mientras que el tratamiento de la mezcla de los tres hongos fue de 44%, no existió diferencia significativa entre tratamientos ($P < 0.05$). Por otra parte, tres semanas después de la aplicación se tomaron datos de insectos con signos de micosis presentando 23% para *B. bassiana* y 22% en la mezcla de hongos, no se encontró una diferencia estadística entre ambos tratamientos. En la mezcla solo se observaron insectos con esporulación de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* e *I. fumosorosea*, para el caso de *M. brunneum* no se presentaron insectos con signos de esporulación. En el bioensayo de la confrontación *in vitro* se determinó el crecimiento radial promedio de los explantes de cada hongo, separados a una distancia de 20 mm entre cada uno. En el medio únicamente con el hongo *B. bassiana*, éste presentó un crecimiento de 0.90 mm/día^{-1} , en la interacción con *M. brunneum* obtuvo un crecimiento de 0.94 mm/día^{-1} y con *I. fumosorosea* fue de 0.74 mm/día^{-1} . Los resultados obtenidos no demuestran antagonismo significativo de *B. bassiana* al mezclarlo con otros hongos entomopatógenos. Los resultados sugieren que *B. bassiana* puede ser aplicado en conjunto con otros hongos como una alternativa para el manejo integrado de *D. citri*.

Palabras Clave: *Beauveria bassiana*, *Diaphorina citri*, Huanglongbing.

INTRODUCCIÓN

El psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* kuwayama (Hemiptera: Liviidae), constituye una de las plagas más devastadoras para la citricultura mundial (Bellis, 2005). Está presente en México desde el 2002 (Lopez-Arroyo *et al.* 2005) y actualmente se encuentra en todas las áreas citrícolas de México. El psílido se alimenta de la planta causándole daño directo al succionar la savia de los brotes y hojas más jóvenes, pero sobretodo es el vector de la enfermedad denominada como Huanglongbing, siendo problema principal en los países que la poseen (Coelho, 2002; Grafton, 2006; Peña, 2006; Subandiyah, 2000). A partir del año 2009 la citricultura nacional se ha visto amenazada por la presencia de esta enfermedad bacteriana conocida como Huanglongbing (HLB), considerada mundialmente una de las enfermedades más graves de los cítricos (Bové, 2006). Esta enfermedad es causada por al menos tres especies de bacterias del género *Candidatus Liberibacter* que no han podido ser cultivadas artificialmente y que están limitadas al floema de las plantas. En el continente americano se tienen reportadas las especies de *Ca. Liberibacter americanus* y *Ca. Liberibacter asiaticus* según Floyd and Krass (2006), esta última es la que está presente en México. Este patógeno ocasiona una muerte gradual del árbol, primeramente reduce la producción y calidad de la fruta y posteriormente ocasiona la muerte del mismo (Halbert and Manjunath, 2004).

México se encuentra entre los principales países productores de cítricos del mundo, de acuerdo a la FAO ocupa el cuarto lugar después de Brasil, la India y Estados Unidos en producción de naranja, mientras que en producción de limón ocupa el segundo lugar después de la India. La superficie sembrada en 2009 de cítricos en México fue de 539,158.68 has siendo el mayor productor el estado de Veracruz con 226,740 hectáreas (CONACYT-SAGARPA, 2012). De cada 20 toneladas de cítricos que se consumen en el planeta una proviene de nuestro país; por producto la proporción es mayor debido a que una de cada 10 toneladas de limón y una de cada 20 toneladas de toronja y naranja es mexicana por lo que

México se ubica como segundo, tercero y quinto lugar en estos cultivos respectivamente, además ocupa la décimo tercera posición como productor de tangerina y mandarina (SAGARAPA, 2012).

El impacto económico generado por la presencia del HLB en países productores de cítricos se ha incrementado año con año debido a pérdidas por disminución en rendimiento, así como acciones de control aplicadas al psílido y al HLB; se estima que los costos de producción son aproximadamente de un 30 a 40% más altos en los últimos años (Sosa *et al.* 2011).

Una alternativa es la aplicación de microorganismos que puedan regular las poblaciones de *Diaphorina citri* en el ambiente y así evitar la transmisión de la enfermedad, convirtiendo con esto a los hongos entomopatógenos como una opción viable para la elaboración de bioplaguicidas que permitan el control del vector, además de ser productos que no causan contaminación y deterioro al ambiente ni efectos negativos a la salud humana. Con la aplicación de los hongos entomopatógenos se podrán reducir los efectos negativos causados por *Diaphorina citri* a los cítricos con lo que se verán beneficiados cientos de productores.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la patogenicidad de hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre el psílido asiático de los cítricos (PAC), *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) vector de la enfermedad HLB.

Objetivos específicos

1. Determinar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* en campo contra *Diaphorina citri*, así como su efecto en mezcla con los hongos entomopatógenos *Metarhizium brunneum* e *Isaria fumosorosea*.
2. Observar la micosis causada por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre cadáveres de los psílidos, por sí sólo y en mezcla con *Metarhizium brunneum* e *Isaria fumosorosea*.
3. Evaluar la interacción de *Beauveria bassiana in vitro* en presencia de *Metarhizium brunneum* e *Isaria fumosorosea*.

REVISIÓN DE LITERATURA

La enfermedad del Huanglongbing (HLB).

Es una enfermedad asiática conocida como Citrus Greening o HLB por abreviatura de 'Huanglongbing', palabra proveniente del chino que significa dragón amarillo, debido a la apariencia que toman las hojas por el desarrollo de la enfermedad. Fue vista por primera vez en China en el año de 1951, posteriormente se reportó en Sudáfrica y después se diseminó a varios países de África y Asia. En el año de 2004 se reportó por primera vez en América, llegando a Sao Paulo, Brasil. En el año de 2005 se confirma en Florida, EUA. Actualmente la enfermedad se encuentra en países de Centro America (Senasica, 2010). Para México la enfermedad se detectó por primera vez en el año del 2009 en los estados de Yucatán y Quintana Roo (Trujillo-Arriaga, 2010., Lopez-Collado, 2015). Debido a la presencia de la enfermedad se han tomado medidas para evitar su dispersión. Se reportan más 63 millones de árboles muertos a causa de esta enfermedad en países de Asia, Africa y America (Senasica, 2010).

Es una enfermedad causada por una bacteria de un grupo de tres especies Gram negativas, que actuan restringiendo el floema de los árboles. Las bacterias pertenecen al género *Candidatus* (*Ca.*) *Liberibacter* (L.); *Ca. L. africanus*, es sensible al calor además de ser exclusiva del continente Africano (Bove, 2006). *Ca. L. asiaticus* es tolerante al calor y distribuida ampliamente a nivel mundial. *Ca. L. americanus* sensible al calor y solo está presente en Brasil (Taxeira et al., 2005). Las bacterias anteriores son transmitidas por insectos psilidos como *Diaphorina citri* Kuwayama y *Trioza erytreae*.

Síntomas causados por el HLB.

Para la sintomatología del HLB en los árboles infectados varía dependiendo de la edad y variedad del cítrico, no son exclusivos de la enfermedad, únicamente sirven como un indicador posible (López-Collado, 2015). El HLB afecta los tejidos del floema (Folimonova et al., 2010), lo que causa fuertes problemas para la traslocación de asimilados en las plantas hospederas (Bové, 2006). En los cítricos, los síntomas se presentan en las hojas como manchas amarillentas con aspecto de moteado (Figura 1), así como el retraso del crecimiento de plantas en desarrollo, la producción de fruta deforme, pequeña y con pobre coloración, la que además puede desprenderse del árbol prematuramente (Bové, 2006; Sagaram et al., 2009). Los síntomas de HLB en hojas pueden confundirse con deficiencias nutricionales o incluso con el daño de plagas y otras enfermedades. No obstante, se presentan características únicas que los distingue (Bové, 2006; Gottwald et al., 2007). Al principio los árboles infectados desarrollan uno o más brotes con hojas amarillas, de ahí el nombre de la enfermedad del brote amarillo (Bové, 2006). Si otras ramas del árbol permanecen sanas o asintomáticas, los daños se manifiestan sectorizados.



Figura 1. Síntomas ocasionados por HLB en hojas de cítricos. Fuente: SENASICA.

Identificación y Diagnostico.

Para la identificación de *Ca. Liberibacter* la primera técnica utilizada fue la microscopia electrónica, con la cual se confirmó por primera vez la enfermedad del HLB infectando árboles (LafLèche y Bové, 1970). Diagnósticos con metodologías y quipos menos complejos se han desarrollado tal es el caso del diagnóstico indirecto a través de marcaje con yodo del almidón que se acumula en cantidades anormales dentro de los cloroplastos del parénquima en empalizada de las hojas infectadas (Shneider, 1968; Taba et al., 2006). La observación de los gránulos de almidón teñidos con el yodo a través del microscopio óptico, ha sido un método posible para el diagnóstico de la enfermedad (Onuki et al., 2002).

Varios métodos de amplificación del ADN, incluyendo la convencional reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR de tiempo real y PCR anidado, han sido usados para la detección de árboles infectados por el HLB. El PCR convencional es el método preferido esto debido al bajo costo y fácil realización. Actualmente el PCR convencional para el diagnóstico del HLB está basado en la amplificación de la región 16_s del ADN ribosomal de la bacteria mediante los cebadores OI1/OI2/OA1 los cuales permiten la amplificación de un fragmente de 1160 pares de bases (pb) de las especies asiática y africana. Para diferenciación de ambas especies, la amplificación de la enzima *Xba I*, obteniéndose un perfil de restricción de tres fragmentos: 520 pb, 506 pb y 130 pb, llevando a cabo la digestión de este producto para la especie africana y estos dos fragmentos: 640 pb y 520 pb para la especie asiática (Jagoueix et al., 1996). Recientemente una prueba robusta y eficiente para la detección del HLB se desarrolló formulando otro cebador para la región 16_s denominado Las0606/LSS el cual se aplica con una metodología más sencilla, realizando un PCR directo con las células bacterianas de las formas, extraídas de las nervaduras centrales de hojas infectadas (Fujikawa et al., 2013).

Importancia y daños en México.

La citricultura es una de las actividades más importantes ocupando México el cuarto lugar en producción de cítricos a nivel mundial. Cuenta con una superficie de 526,000 hectáreas destinada a la citricultura en los 23 estados y con una producción estimada de 6.7 millones de toneladas anuales con un valor de más de 8 mil 50 millones de pesos, teniendo como primer lugar la producción de limón “mexicano” y en segundo lugar el limón “persa”. Generando 70 mil empleos directos y 250 mil indirectos (SENASICA, 2010). En el año del 2008 se lanzaron campañas con la finalidad de proteger la actividad citrícola en México con el objetivo de detectar oportunamente la enfermedad. Durante el año 2009, se notificó la presencia en HLB en los estados de Yucatan (Tizmin) y Quintana Roo (Lázaro Cárdenas) por lo cual se iniciaron actividades ante la emergencia así como las medidas regeulatorias establecidas en la NOM-EME-047-FITO-2009 (Trujillo, 2010). Datos que hablan sobre la fuerte problemática que se podría tener si no se siguen buscando alternativas eficaces para el control de esta enfermedad, caso específico, el municipio de Tecomán, Colima, México, que ha sido declarada como zona siniestrada por presentar HLB en todas las huertas de cítricos (Robles-Gonzales et al., 2013).

El Psílido Asiático de los Cítricos *Diaphorina citri* kuwayama.

El psílido asiático de los cítricos (PAC) *Diaphorina citri* ataca una amplia gama de especies de la familia Rutaceae, debido a que especies de esta familia son abundantes en los países donde se distribuye la plaga, por ello se ha extendido a zonas citrícolas a nivel mundial (Hall, 2008). Siendo sus poblaciones bajas en las estaciones secas, aumentando rápidamente durante el primer rebrote con el inicio de las lluvias (Gatling 1970).

Shinchinku en 1907, describió a esta plaga observándolos en los cultivos de cítricos en Taiwan. Existen diferentes especies de *Diaphorina*, las cuales son identificadas de acuerdo al patrón de venación de las alas delanteras y además de la forma de las curvas genales,

Clasificación taxonómica.

Reino: Metazoa.

Phyllum: Arthropoda.

Clase: Insecta.

Orden: Hemiptera.

Suborden: Sternorrhyncha.

Familia: Liviidae.

Subfamilia: Liviinae.

Género: *Diaphorina*.

Especie: *D. citri* Kuwayama.

(Burckhardt and Ouvrard 2012).

Presencia del PAC en México.

El PAC fue encontrado en México en el año del 2002 en los estados de Campeche y Quintana Roo, lo cual ha causado una dispersión a lo largo de estos años. Actualmente está presente en todas las zonas citrícolas de México (Figura 2), siendo un insecto plaga con una categoría cuarentenaria (Miranda-Salcedo y López Arroyo, 2009).



Figura 2. Distribución (en verde) de *Diaphorina citri* Kuwayama en México de acuerdo a SENASICA (2010).

Hospedantes.

Existen plantas preferentes de este insecto vector y de acuerdo con la NOM-EM-047-FITO-2009 (Cuadro 1), son hospederas de esta plaga y susceptibles al HLB.

Cuadro 1. Plantas hospederas de *D. citri*.

Nombre científico	Nombre común
<i>Citrus x paradisi</i> Macfad.	Torojo
<i>Citrus amblycarpa</i> Ochese	Mandarino
<i>Murraya paniculada</i>	Limonaria
<i>Citrus latifolia</i> Tanaka	Limon Persa
<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm) Swingle	Limon Mexicano
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Naranja Dulce
<i>Citrus aurantium</i> L.	Naranja Agrio

Biología y características morfológicas de PAC.

El psílido asiático de los cítricos presenta un ciclo de vida de 90-120 días aproximadamente con una alta fecundidad, las hembras tienen un periodo de oviposición de 12 días llegando a depositar más de 700 huevecillos durante su ciclo de vida. Estos huevecillos puede eclosionar al tercer día durante el verano y durante invierno pueden tardar 23 días (Yang et al., 2006). Las hembras del PAC pueden solo ovipositar en ramas tiernas pero en la ausencia de estas pueden no ovipositar por cierto periodo (Tsai y Liu, 2000).

La temperatura relativa, humedad y el contenido nutricional de las hojas son factores determinantes del incremento de los niveles de poblaciones del PAC. Hasta el momento no se han encontrado en una altitud de 1300-1500 msnm, esto es debido por las heladas ocasionales (Aubert, 1987).

Las poblaciones pueden decaer en época de invierno sin embargo no presentan diapausa. Los adultos presentan una característica distintiva, se alimentan en una posición inclinada, el cuerpo esta levantado y con la parte frontal pegada hacia su alimento, además de que brincan cortas distancias al momento de ser perturbados, y que ellos pueden vivir por un periodo largo esperando en sus plantas hospedantes sobre los brotes de los cítricos para dar comienzo a su reproducción (Halbert and Manjunath, 2004; Martínez-Carrillo, 2009).

Fernández y colaboradores (2005) nos dice que sufren de diformismo sexual lo que permite saber la distinción de los sexos, además de que el aparato genital ayuda en la diferenciación siendo el macho con unos ojos compuestos en tonalidad rojizos y un abdomen pequeño.

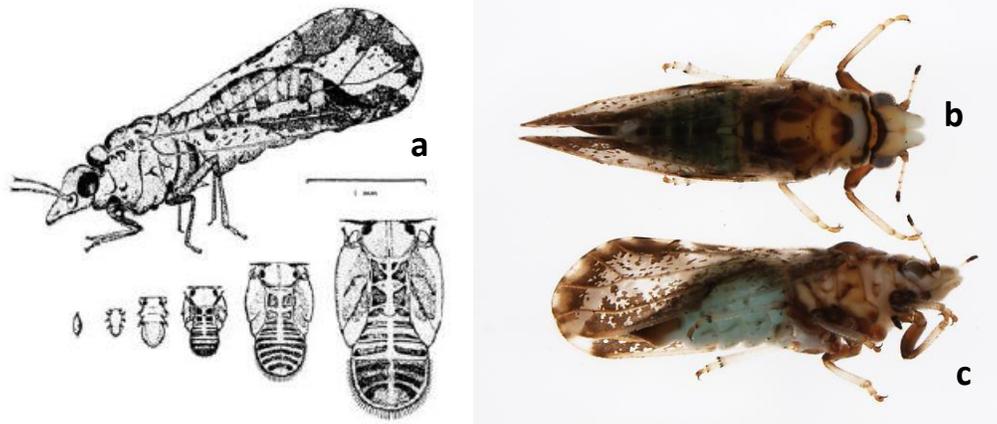


Figura 3. Ciclo de vida de *Diaphorina citri* kuwayama (a). Vista Dorsal (b), vista lateral (c), de adulto de PAC. Fuente: Nathan Cottrell. Bugguide.net.

Huevos.

Son de forma ovoide, alargados, con prolongación en una de las puntas. Recién ovipositados son de color amarillo claro tornándose a un color brillante anaranjado cercano a la eclosión, miden aproximadamente 0.30 mm de longitud y 0.14 mm de ancho (Fonseca *et al.* 2007).



Figura 4. Huevos ovipositados sobre brotes jóvenes de cítrico. Fuente: Douglas L. Caldwell. Sistema de monitoreo de Diaphorina (SIMDIA).

Ninfas.

Son aplanadas dorsoventralmente de color anaranjado-amarillo, con esbozos alares abultados conspicuos, un par de ojos rojos compuestos y dos

antenas de color negro; presentan filamentos a lo largo del abdomen, hilos cerosos cortos que pueden estar presentes sólo en el ápice del abdomen. Tienen 5 estadios ninfales, el primer estadio miden 0.25 mm aproximadamente de longitud, mientras que las del quinto instar miden de 1.5 a 1.7 mm de longitud y este último instar presenta la característica de los primordios alares de mayor tamaño y dando lugar al nacimiento de los adultos (Tsai y Ying 2000; Martínez-Carrillo, 2009).



Figura 4. Ninfas de *Diaphorina citri* secretando “cera” distintiva. Fuente BOUVET, J. P. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA); Unidad Asociada de Entomología Agrícola UJI-IVIA: Centro de Protección Vegetal y Biotecnología.

Adulto.

Presenta un cuerpo de color café moteado, recubierto de polvo ceroso, ojos rojos, cabeza marrón claro, el primer par de alas más ancho en el extremo con áreas color oscuro. Las antenas presentan el ápice negro con dos manchas marrón claro en la parte media. Los machos son más pequeños que las hembras con la punta del abdomen redondeada, mientras que el abdomen de la hembra termina en una punta bien marcada. Los adultos pueden medir entre 3-4 mm, el tamaño promedio, generalmente se encuentran en posición inclinada con la parte posterior del cuerpo hacia arriba, los adultos tienen poca capacidad para sostener vuelos largos, pero pueden ser transportados a grandes distancias por corrientes de aire (Wenninger y Hall 2008).



Figura 5. Adulto de *Diaphorina citri* kuwayama, presentando características distintivas. Fuente: Carlos E. G. Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario, Palmira, Valle.

Síntomas de daño ocasionados por *Diaphorina citri*.

Al succionar la savia de los tejidos causa una distorsión de las hojas con deformaciones características que permiten identificar el daño, debilitan la planta y en grandes poblaciones puede causar mortalidad de ramas y del árbol; el daño más serio que ocasiona es la transmisión de una enfermedad bacteriana conocida como Huanglongbing (HLB) que una vez adquirida se reproduce en el insecto de tal forma que este puede ser infectivo toda su vida (Alemán *et al*, 2007)

Métodos de Muestreo.

Además de los síntomas visibles es importante realizar un muestreo para la detección de estos insectos. Los huevos son colocados en gran número en el extremo de los brotes tiernos y entre las hojas tiernas. Las ninfas se encuentran sobre brotes tiernos y pecíolos. Pueden doblar las hojas al momento de su alimentación así como la producción de un hilo de cera enrollados en espiral de

color blanco, con lo cual es más fácil detectar la presencia de inmaduros sobre el hospedero (Sinavef, 2007).

Distribución de *Diaphorina citri* en el mundo.

En el mundo el insecto está distribuido en regiones tropicales y subtropicales de Asia, (China, Filipinas, India, Indonesia, Singapur, Tailandia), del Continente Americano (E.U, México, Cuba, Brasil, Argentina) y África (Serena, 2009). *D. citri* es el principal vector de la bacteria *C. L. asiaticus* y *americanus*.

La distribución de *Diaphorina citri* en México.

El Psílido asiático de los cítricos fue detectado en el año 2002 en los estados de Campeche y Quintana Roo, desde donde se ha distribuido ampliamente en todas las áreas citrícolas del país. Se ha distribuido en los estados costeros de ambos litorales y en la península de Yucatán, presentándose con mayor intensidad en Yucatán, Campeche, Quintana Roo, Colima, Veracruz, Tamaulipas y Sinaloa (CONACYT-SAGARPA 2012).

Importancia Económica

Provoca dos tipos de daño, el directo es causado por ninfas y adultos que se alimentan de brotes jóvenes, transmiten toxinas causando deformación y pérdida de brotes, lo que debilita las plantas trayendo como consecuencia una disminución en producción; el daño indirecto es llevado a cabo por los adultos que se les atribuye ser transmisores del agente causal del Huanglongbing causado por

la bacteria *Candidatus Liberibacter* que una vez infectadas las plantas no llegan a vivir más de 5 a 8 años (García, 2012).

Tipos de Control

Para el manejo y control de esta plaga se han aplicado además de productos químicos, productos naturales como el Neem de los cuales se han obtenido buenos resultados. Sin embargo con las aplicaciones se ha observado la aparición de plagas secundarias y la disminución de enemigos naturales; Debido a que no existen métodos curativos de HLB, el control es preventivo y basado principalmente en la eliminación de inóculo mediante la eliminación de los árboles infectados y tratamientos químicos contra los vectores (Bové, 2006).

Control químico de *Diaphorina citri*

Para el control del PAC actualmente se ha trabajado mucho en la industria de los cítricos con la aplicación de productos químicos, utilizando insecticidas como dimetoato, aldicarb, monocrotofos, deltametrina, cipermetrina, clorpirifos, diclorvos, endosulfán y malatión con resultados hasta 90% en la reducción de dicho insecto durante 7 días después de las aplicaciones (Bové, 1996; Dahiya et al., 1994). Además del uso de ingredientes activos como metamidofos, imidacloprid, abacmectina, Neem (*Azadirachta indica*) y también aceites minerales (Kumar et al., 2005; Yang et al., 2006; Srinivasan et al., 2008; Cocco y Hoy, 2008).

Control biológico de *Diaphorina citri*

El control biológico es otra alternativa con que se cuenta para combatir el psílido asiático de los cítricos. Su manejo se basa mediante el uso de enemigos naturales como parasitoides, depredadores y hongos entomopatógenos. Se han introducido parasitoides como *Tamarixia radiata* y *Diaphorencyrtus aligarhensis*, depredadores como *Chilocorus cacti*, *Olla v-nigrum*, *Harmonia axiridis* y hongos entomopatógeno como *Hirsutella citriformis*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium brunneum* e *Isaria fumosorosea* de los cuales se han obtenido buenos resultados. Rodríguez et al. (2012) buscaron establecer un control biológico mediante la aplicación de depredadores, parasitoides y entomopatógenos. En su trabajo se encontraron ocho especies de enemigos naturales de *D. citri* de los cuales *Olla v-nigrum*, *Chilocorus cacti*, *Cycloneda sanguinea*, *Nephus* sp., *Pentilia* sp. Y *Ceraeochrysa* sp. Fueron depredadores; *Tamarixia radiata* fue el único parasitoide y como entomopatógeno se identificó *Beauveria bassiana*. Por otra parte Mondaca et al. (2010) en Sonora detectaron cuatro especies de depredadores asociados a *Diaphorina citri*, entre las que se encontraron 2 especies de crisopas (*Chrysoperla comache* y *Chrysoperla rufilabris*) y catarinitas (*Cycloneda sanguínea* y *Olla v.nigrum*). Mientras que en condiciones de laboratorio se ha utilizado *Amblyseius swirskii* para control de *Diaphorina citri*, observándose un alto porcentaje de mortandad (Blasco et al. 2012).

Los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial como agentes de control; constituyen un grupo con más de 750 especies que al dispersarse en el ambiente provocan infecciones fúngicas a las poblaciones de insectos (Díaz et al. 2006). Por ello son ampliamente reconocidos por su potencial como agentes de biocontrol, debido a que la mayoría de los insectos son susceptibles a enfermedades fungosas y a su modo de infección distintivo a diferencia de otros agentes como bacterias, virus y protozoarios; debido a que no requieren ser ingeridos para causar infección; en su lugar las esporas germinan y pueden

penetrar directamente la cutícula por lo que son catalogados como insecticidas de contacto además de que todas las estructuras (conidios, micelio y blastosporas) tienen potencial de ser usados como agentes de control. Este modo de infección es posible gracias a la acción coordinada de enzimas hidrolíticas, además de la presión mecánica ejercida en el punto de contacto por lo que las enzimas son determinantes en el éxito de la infección (Carrillo y Blanco, 2009).

Descripción de hongo *Beauveria bassiana*.

***Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin.**

El hongo entomopatógeno conocido como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Ascomycota: Hypocreales), descrito por primera vez por Agostino Bassi (1834), como agente causante de la “*Mal del signo*”, “*Carcino*” ó también conocido como “*muscardina*” en Francia, la cual causó la una devastadora epizootia a la larva domestica del gusano de seda (*Bombix mori* L.) en el suroeste de Europa durante los siglos 18 y 19. Los estudios realizados por Bassi, fueron los primeros en demostrar que estos organismos pueden actuar como patógenos de insectos (Ainsworth, 1973), sin embargo, el primer reconocimiento taxonómico fue propuesto por Balsamo-Crivelli en 1912 (Rehner, 2005).

B. bassiana tiene la habilidad de vivir de manera parasítica y saprofita, lo que le permite sobrevivir en presencia o ausencia de insectos huésped. Cuando se encuentra en materia orgánica, su morfología micelial genera una red amplia filamentosa originada a partir de un conidio; sin embargo, en presencia de un insecto huésped, el conidio germina una vez dentro del insecto forma una red de hifas que una vez colonizada, pasa nuevamente a una formar estructuras similares a la de levadura. La unión de una espora fúngica a la superficie de la cutícula de un huésped susceptible representa el evento inicial en el establecimiento de micosis. *Beauveria bassiana* al igual que muchos hongos entomopatógenos al

germinar la espora forman una estructura denominada apresorio con la que se inicia la invasión del hospedero (Hong, 2003).

Clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana*.

Reino: Fungí

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Beauveria*

Especie: *bassiana* (Bals.) Vuill.

Caracterización taxonómica de *B. bassiana* tomado de NCBI taxonomy database.

Características del *Beauveria bassiana*.

Las características del género *Beauveria* sp. son: conidióforos sencillos, agrupados irregularmente o en grupos verticilados, en algunas especies hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene la conidia, la cual se presenta en forma de zig-zag, las conidias son hialinas, redondeadas a avooides y unicelulares (Bustillos, 2001; Rodríguez y Del Pozo, 2003).

Samson *et al* (1998) describe a *Beauveria bassiana* que posee conidias globosas a subglobosas, las estructuras conidióforas forman densos grupos. El

hongo produce una enfermedad sobre el hospedero manifestando en primera instancia por un crecimiento algodonoso, blanco o harinoso y que generalmente se envuelve en el insecto. Los conidióforos forman paquetes cerrados de conidios, de un color blanco cremoso. El conidio germina sobre el integumento de otros insectos, produciendo una hifa que penetra a la pared del insecto. El insecto muere aproximadamente en tres días después a causa de la infección, las hifas llenan la cavidad del cuerpo del insecto, finalmente emerge y cubren el cuerpo con un típico crecimiento micelial blanco (Zimmerman, 2007). La colonia de *B. bassiana* en PDA a los 14 días es algodonosa a polvorienta de color blanco a medida que pasa el tiempo se vuelve amarillenta cremosa, presenta conidióforos de 1 a 2 μm de diámetro donde crecen las células conidiogenas en grupos grandes, estas células están agrupadas formando grupos grandes, en ocasiones las células conidiogenas se ramifican formando células conidiogenas secundarias en la que se forma un raquis que sostiene las conidias. Las conidias son hialinas globosas a subglobosas de 2 a 3 μm que se insertan sucesivamente en el raquis en forma opuesta (Ames 2004).

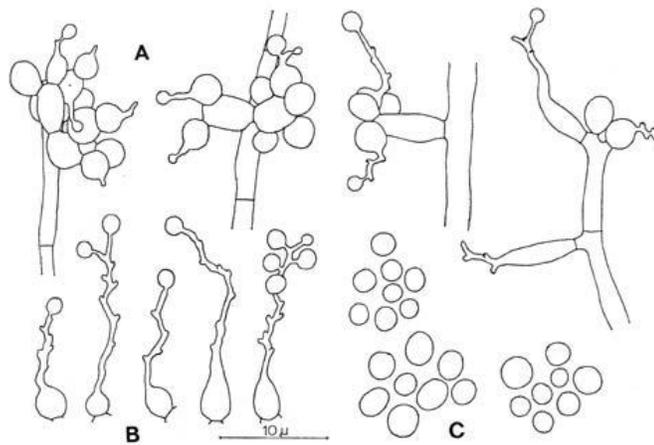


Figura 6. *B. bassiana*: Estructuras conidiales agrupados (A), Fialides [células de los conidióforos con la base en forma de botella] (B), Conidios globosos a subglobosos (C).

Incidencia Natural.

Existen varios reportes de la incidencia natural de *B. bassiana* causando epizootias, sobre insectos de importancia agrícola y forestal (Rockwood, 1951; Milliron y Mac Creary, 1955; citados por Mendez, 1990).



Figura 7. Scarabeidae infectado de forma natural en bosque de Nueva Zelanda.
Fuente: thehiddenforest.co.nz.

Modo de acción de hongos entomopatógenos.

Los hongos entomopatógenos causan la muerte del huésped por deficiencia nutricional, invasión, digestión de tejidos o por liberación de toxinas. Las especies entomopatógenas penetran la cutícula del huésped e invaden el intestino, la cavidad bucal, anal y por los espiráculos, estas infecciones son iniciadas por esporas o conidios, inician su proceso infectivo cuando las conidias retenidas en el integumento inician el proceso de germinación, con el que el hongo comienza a secretar enzimas como las proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas y lipoxigenasas (Hajek y Leger, 1994). Estas enzimas degradan la cutícula del insecto y coadyuvan en el proceso de penetración por presión mecánica iniciado por el apresorio. Una vez dentro del insecto se desarrolla como cuerpos hifales que se van disseminando a través del hemocele invadiendo tejidos musculares,

cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias y hemocitos, ocasionando la muerte del insecto después de 3 a 14 días iniciada la infección (Clarkson y Charnley, 1996).

Una vez muerto el insecto y agotados los nutrientes, el hongo inicia un crecimiento micelial invadiendo los órganos del hospedero. Finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie, donde en condiciones ambientales apropiadas inician la formación de nuevas conidias (De la Torre *et al.* 2006; Nicholls, 2008). En *B. bassiana*, y *M. brunneum*, este proceso consta de las siguientes etapas (Figura):

Etapa uno. Adhesión, se inicia con la adherencia de la espóra fúngica en la cutícula del insecto.

Etapa dos. Se inicia con la germinación de la espóra, esta etapa depende de la disponibilidad de nutrientes para que la germinación de la espóra sea exitosa.

Etapa tres. Penetración de la cutícula por el tubo germinal, la invasión de la cutícula está precedida por la formación del apresorio, en la invasión cuticular se involucran actividades enzimáticas y físicas (Samsinakova *et al.* 1971). Las enzimas degradan la capa externa de la cutícula, liberando pequeños fragmentos peptídicos de aproximadamente cinco aminoácidos de longitud que son utilizados por el hongo como nutrientes.

Etapa cuatro. Consiste en el desarrollo del hongo en el hemocele y los tejidos (Hong, 2003; Bustillo y Posada, 1986). Una vez que los hongos han alcanzado la hemolinfa de los insectos estos producen enzimas del tipo de las glicosidasas, las cuales les permiten capturar los nutrientes que son propios del insecto, también en esta etapa producen proteínas que actúan como toxinas, en *B. bassiana*, *M. brunneum* se ha reportado la producción de ácido oxálico, ácido 2,6-piridin-dicarboxílico, que poseen propiedades insecticidas contra larvas de

Calliphora erythrocephala; también se han reportado toxinas peptídicas tóxicas contra larvas de *Choristoneura fumiferana*, la acción de estos compuestos es específica para ciertos grupos de insectos y su acción se debe a la acción sinérgica de un complejo de compuestos (Quintero, 1998).

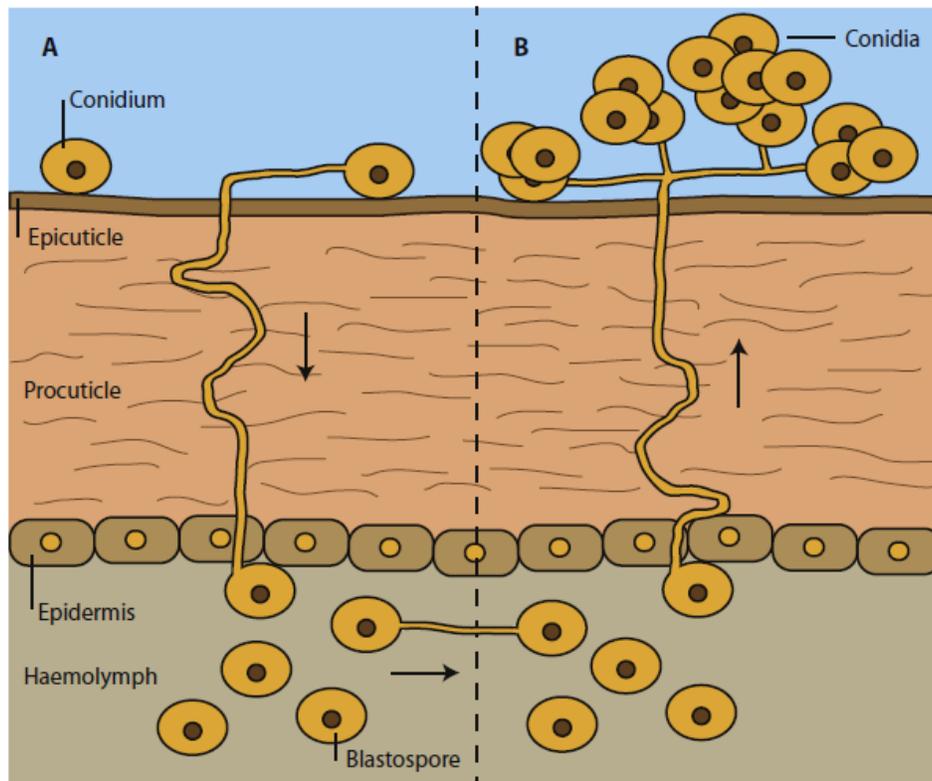


Figura 8. Ciclo infeccioso de *Beauveria bassiana*. (A) Conidia se adhiere a su hospedero induciendo la germinación. 1. Producción del tubo germinativo. 2. Presión mecánica y secreción de enzimas para atravesar la cutícula. 3. Se activa la producción de blastosporas para colonizar el hemocele. 4. Las toxinas se alimentan de azúcares de la hemolinfa. 5. Las blastosporas segregan toxinas provocando la muerte. (B) Una vez el hospedero muerto el hongo atraviesa la cutícula desde el interior y esporula sobre el cadáver. Las flechas indican la dirección del desarrollo fúngico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización.

El trabajo de investigación se llevó a cabo de Octubre del 2013 a Mayo del 2014 en las cámaras bioclimáticas y laboratorios del departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), localizada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México y en las instalaciones del Campo Experimental General Terán del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Durante este periodo la metodología de los ensayos fue dividida en 2 partes, dónde la etapa inicial comprende la obtención de cepas y formulación del producto biológico en los laboratorios y la etapa final fue la aplicación del producto en campo, correspondiente a una huerta de naranja (*Citrus sinensis* var. Valencia) ubicada a 25°17'23" N, 99°39'08"W, en el municipio de General Terán, Nuevo León, México.

Bioensayo 1. Mortalidad inducida sobre *Diaphorina citri* en campo.

Obtención de Cepas.

Este proceso comprende el uso de tres hongos entomopatógenos descritos a continuación:

- Cepa B6C. *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin, aislado de un chapulín infectado en campo agrícola de la UAAAN-Saltillo, Coahuila, México (25°21'30"N, 101°02'20"W).
- Cepa 6M11. *M. brunneum* Petch, aislado de suelo agrícola mediante la técnica propuesta por Sánchez-Peña et al. (2011)

en Yerbaniz, Santiago, Nuevo León, México (25°30'04"N, 100°11'40"W).

- Cepa IF8B19. *I. fumosorosea* Wize, aislado de *D. citri* en San Pedrito, Gómez Farías, Tamaulipas, México (22°59'33"N, 99°08'34.82"W).

Para la purificación de las cepas, se utilizó la técnica de Lacey (1997) y Sánchez-Peña et al. (2011), en la cual, los insectos se desinfectaron al pasarlos 30 segundos en agua destilada, 1 min en hipoclorito de sodio al 10%, 30 segundos en alcohol al 70%, 1 minuto en agua estéril, 1 minuto en estreptomycinina al 0.05% y 30 segundos con agua estéril. Posteriormente los insectos se colocaron en cámara húmeda estéril (caja Petri con algodón humedecido) a temperatura ambiente durante cinco días, para inducir la esporulación de los hongos. Todas las cepas fueron almacenadas en la colección de hongos entomopatógenos del departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Producción de *Beauveria bassiana* en un medio artificial (PDAL).

Los hongos entomopatógenos utilizados en este trabajo, fueron incrementados en el medio de cultivo PDAL, mismo que fue preparado utilizando 39 g de PDA de la marca comercial MCD LAB® (compuesto de: 200 g de infusión de papa, 20 g de dextrosa y 15 g de agar bacteriológico), colocados en un matraz Erlenmeyer por cada litro y adicionando 5 g más de Levadura (Nevada® SAFMEX). Posteriormente fue esterilizado a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 minutos. Después el PDAL fue vaciado en cajas Petri de 9 cm de diámetro bajo condiciones estériles, como medida de prevención todas las cajas fueron selladas y almacenadas a 4 °C hasta su utilización.

El hongo fue replicado en medio de cultivo PDAL mediante la técnica de estría, la cual consiste en tomar conidios y esparcirlos con un asa bacteriológica

estéril en forma de zigzag a través del medio de cultivo. Las cajas Petri fueron colocadas a temperatura ambiente hasta su esporulación. Una vez esporulados fueron nuevamente guardados a 4 °C para evitar contaminación hasta su uso en el bioensayo.

Conteo de Esporas.

Todos los conteos de esporas en cada experimento dentro del bioensayo fueron llevados a cabo con un hemocitómetro o cámara de Neubauer en un microscopio a 400x, siguiendo la metodología de Goettel e Inglis (1994).

Viabilidad de esporas.

Se evaluó la germinación de las esporas con la finalidad de observar la viabilidad que presentaban; para el hongo *B. bassiana* se utilizó una suspensión con una concentración de 1.0×10^7 conidios mL^{-1} . Se tomaron 0.5 mL de la solución anterior esparciéndolas en PDAL dentro de cajas Petri. Después de 24 horas se realizaron las observaciones en un microscopio a 40x y se contabilizaron 100 esporas dentro de un campo óptico. Este procedimiento se realizó en las 5 cajas Petri y se obtuvo un promedio.

Aplicación de *Beauveria bassiana* en campo.

Tres tratamientos fueron utilizados en este experimento, en el primer tratamiento se cosecharon conidias de *B. bassiana* directamente de cajas Petri y fueron suspendidas en agua estéril con surfactante Bionex (0.05% v/v) (Arysta Lifesciences). La concentración de conidias fue determinada en una cámara de Neubauer y se ajustó a 1.3×10^8 conidias viables mL^{-1} . El segundo tratamiento fue

una mezcla de hongos entomopatógenos; *B. bassiana* (B6C), *M. brunneum* (6M11) e *I. fumosorosea* (IF8B19), ajustados a una concentración de 1.40×10^4 conidios viables mL^{-1} . Por último un tratamiento de agua estéril más surfactante Bionex (0.05% v/v) como control. Las pruebas de germinación fueron realizadas para los tratamientos con la metodología antes descrita.

La aplicación fue realizada el 16 de Octubre de 2013 a las 4:00 pm con una temperatura media de 22.6 °C y 84.36% de humedad relativa, en General Terán, Nuevo León. Los psílidos adultos fueron capturados de campo con aspiradores y colocados en bolsas de malla, que permitieron la ventilación y manteniéndolos dentro de la bolsa, cada bolsa contenía 20 psílidos, En esta evaluación se utilizaron 39 bolsas las cuales fueron colocadas en 20 árboles de naranja Valencia (*Citrus sinensis* var. Valencia) de aproximadamente 25 años de edad, con ± 1 año posterior a una poda de rejuvenecimiento. Las bolsas de malla se colocaron dos por cada árbol sobre brotes frescos, una de lado norte y la otra de lado sur de la copa del árbol. El diseño experimental se consideró como completamente al azar. Se utilizaron 13 de estas mallas para cada tratamiento y se asperjaron con un atomizador de mano, conteniendo 100 mL de las formulaciones para cada tratamiento.

Siete días después de la aplicación el 23 de Octubre con una temperatura media de 18.21 °C y 68.69% HR, las bolsas de malla fueron colectadas para cuantificar la mortalidad inducida por los tratamientos. Los insectos muertos de cada repetición se colocaron en cámara húmeda con una temperatura de 25 ± 1 °C durante dos semanas, posteriormente el porcentaje de insectos infectados fue determinado en base a la cuantificación de insectos con presencias de micosis externa en el integumento, vistos en cada tratamiento.

Cuadro 2. Tratamientos de hongos entomopatógenos sobre *Diaphorina citri* en prueba de campo.

Tratamiento	N	Concentración	Cepa
Control Bionex	13	-	-
<i>Beauveria bassiana</i>	13	1.30x10 ⁸	B6C
Mix de tres hongos entomopatógenos	13	1.40x10 ⁸	B6C, 6M11, IF8B19

Bioensayo 2. Confrontación de hongos entomopatógenos sobre medio artificial PDA.

Los hongos entomopatógenos utilizados en este bioensayo de confrontación los cuales fueron previamente cultivados en PDA con la finalidad de producir micelio suficiente:

Cuadro 3. Hongos entomopatógenos usados en la confrontación *in vitro*.

Especie	Cepa
<i>Beauveria bassiana</i> Vuill	B6C
<i>Metarhizium brunneum</i> Petch.	6M11
<i>Isaria fumosorosea</i> Wise	IF8B19

Posterior a tres días de haberlo inoculado sobre el medio, fueron extraídos discos de 10 mm de diámetro con ayuda de un sacabocados, los cuales fueron tomados de la orilla de cada colonia fúngica. Cada explante o disco fue colocado sobre una nueva caja Petri con medio PDA a 20 mm de distancia entre cada explante de confrontación (Figura), Para el tratamiento control, solo un explante de

B. bassiana fue colocado al centro de la caja Petri. En cada tratamiento constaba de 12 repeticiones y fueron almacenados en condiciones similares a una temperatura de ± 25 °C.

Cuadro 4. Confrontaciones de *B. bassiana* con otros hongos entomopatógenos en laboratorio.

Tratamientos	Cepas	N
<i>B. bassiana</i> control	B6C	12
<i>B. bassiana</i> / <i>M. brunneum</i>	B6C/6M11	12
<i>B. bassiana</i> / <i>I. fumosorosea</i>	B6C/IF8B16	12

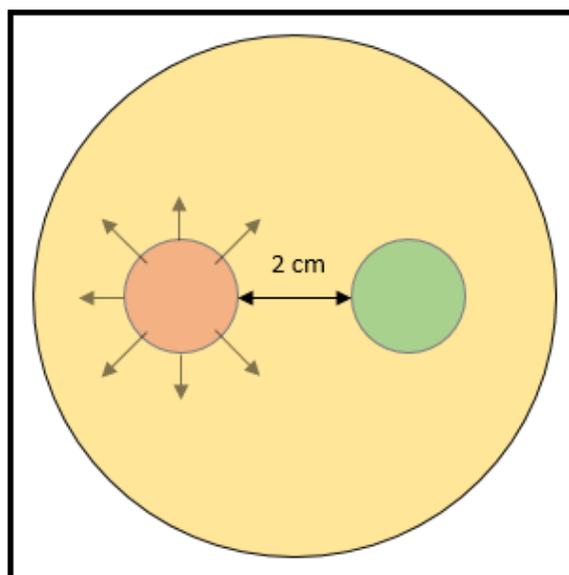


Figura 9. Diagrama de posición de los explantes a confrontar, a una distancia de 2 cm entre los bordes de los discos. Las medidas fueron tomadas del centro del disco en dirección al otro.

El crecimiento radial generado por los discos fúngicos fue medido en relación del hongo *B. bassiana* hacia su confrontación, esto se hizo diariamente durante 5 días para obtener un promedio de crecimiento radial y el cual se tomó como un diseño completamente al azar.

Análisis de datos.

En los bioensayos realizados de la presente investigación; los datos fueron sometidos a un Análisis de varianza (ANOVA), además del estadístico de Levene para la igualdad de varianzas. La mortalidad en los tratamientos de la aplicación de campo (entomopatógenos vs psílicos), fue corregida mediante la fórmula de Schneider-Orelli y fueron estandarizados a proporciones. Al no cumplir la normalidad las mortalidades de todos los tratamientos fueron transformados con arcoseno $\text{Sen}^{-1}(\sqrt{x})$ para proporciones (0-1) y raíz cuadrada para las mediciones.

Los datos obtenidos en el bioensayo *in vitro* fueron sometidos a un Análisis de Varianza (ANOVA), y una separación de medias usando la prueba de Tukey, Todas los análisis y pruebas fueron realizados con ayuda del paquete estadístico SPSS v.19.

RESULTADOS

Bioensayo 1. Mortalidad de *Diaphorina citri* en campo inducida por conidias de *Beauveria bassiana* y combinación de hongos

Los resultados se muestran en porcentajes, siendo para el testigo (Agua + Bionex), una mortalidad promedio de 44.9 %, posteriormente la mortalidad fue corregida y se obtuvieron porcentajes de 40.4% para el tratamiento de *Beauveria bassiana* y 44.2% para el mix de los tres hongos entomopatógenos a una concentración de 1.3 y 1.4×10^8 respectivamente (Cuadro 5), ambos tratamientos mostraron patogenicidad sobre psílido asiático de los cítricos (Figura 11).

Cuadro 5. Medias de la mortalidad corregida (\pm error estándar), e intervalos de confianza al 95 % de los tratamientos contra *Diaphorina citri*.

Tratamiento	Concentración	Media de Mortalidad (%) (\pm EE)	95 % IC	
			Límite inferior	Límite superior
<i>Beauveria bassiana</i>	1.3×10^8	40.4 \pm 7.74 a ¹	23.53	57.27
Mix hongos entomopatógenos	1.4×10^8	44.20 \pm 9.18 a	24.19	64.23

¹Medias de mortalidad con diferente letra indican diferencia significativa en base a intervalos de confianza 95%.

Las diferencias entre los tratamientos no fueron estadísticamente significativas; $F_{1,24} = 0.160$, $P = 0.692$. Este análisis de varianza (Cuadro 6), compara los valores sobre los tratamientos fúngicos después de 3 semanas de aplicación. Para el tratamiento control Bionex no presento insectos micosados, obteniendo una corrección de arcoseno 0, y el ANOVA no puede analizar este tipo de datos.

Cuadro 6. Análisis de varianza de los tratamientos patogénicos sobre *Diaphorina citri* en brotes de *Citrus sinensi* var. Valencia.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.028	1	.028	.160	.692
Intra-grupos	4.152	24	.173		
Total	4.180	25			

FV: Fuente de variación; gl: Grado de libertad; F: F calculada de los tratamientos.

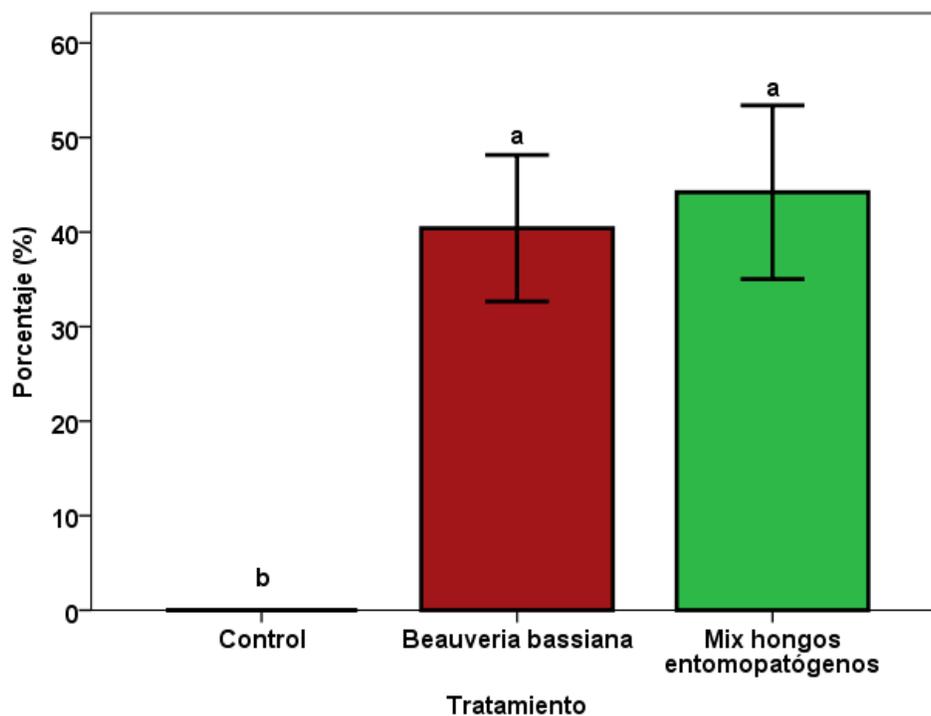


Figura 10. Comparación de medias de mortalidad corregida y barras de error estándar contra *Diaphorina citri* en campo con intervalo de confianza del 95%, letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Esporulación sobre los psílicos.

Los porcentajes de esporulación para el mix de los tres hongos entomopatógenos fue de 22.05%; los hongos dentro del mix corresponden a los siguientes resultados: para *B. bassiana* en los cadáveres de los psílicos se obtuvo un 58.3 % siendo el más alto, seguido por *I. fumosorosea* con 41.7% y por ultimo *M. brunneum* en el cuál no se presentaron insectos micosados por este hongo como lo muestra la figura 11; en comparación con el tratamiento solo por *Beauveria bassiana* en el cual se obtuvo una esporulación de 27.08% insectos micosados.

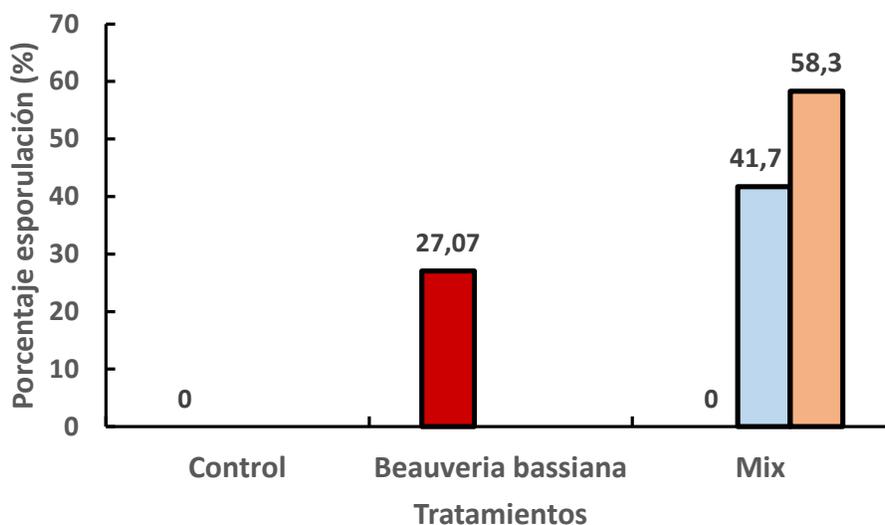


Figura 11. Porcentajes de esporulación de *Beauveria bassiana* (27%), sobre insectos muertos del psílido asiático de los cítricos y el tratamiento combinado Mix: *Metarhizium brunneum* (0%), *Beauveria bassiana* (41%), *Isaria fumosorosea* (58%).

Cuadro 7. Análisis de varianza de esporulación por los hongos entomopatógenos sobre el psílido asiático de los cítricos.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.015	1	.015	.438	.515
Intra-grupos	.824	24	.034		
Total	.839	25			

FV: Fuente de variación; gl: Grado de libertad; F: F calculada de los tratamientos.

El análisis de varianza muestra que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos de los hongos entomopatógenos muestra una significancia de 0.515 por encima de 0.05, este método no analizó los datos del control debido a que la corrección por Arcsine dio un resultado nulo (Cuadro 7).

En la figura 12, compara los porcentajes de esporulación total de los tratamientos fúngicos sobre los insectos de *Diaphorina citri*, siendo *Beauveria bassiana* 27.08 % mientras que el mix fue menor con el 22.05 %. Para el control no presentó insectos micosados por los entomopatógenos. Ambos tratamientos fúngicos resultaron patógenos para el PAC.

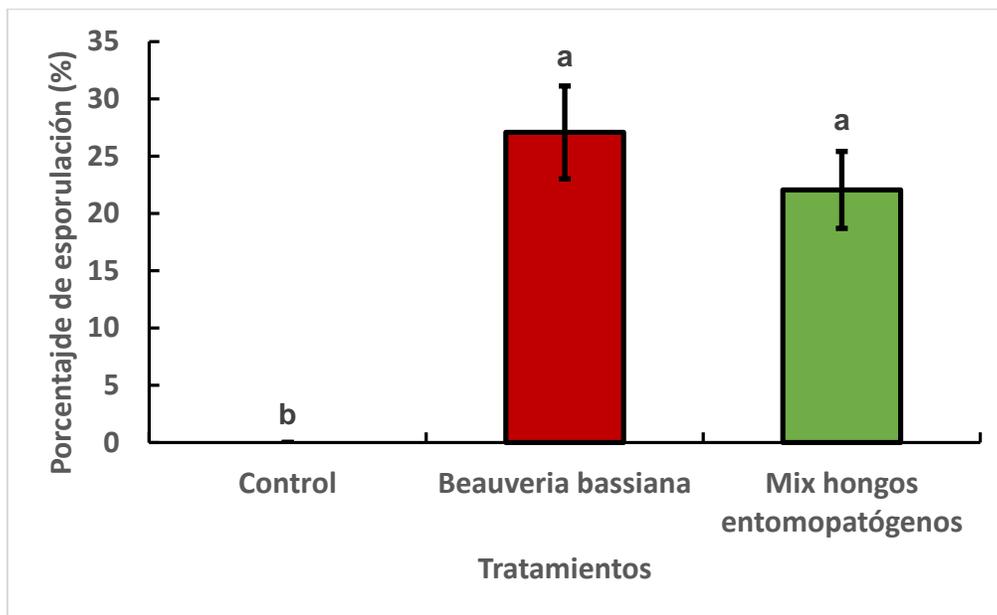


Figura 12. Porcentajes de esporulación en los tratamientos fúngicos sobre el psílido asiático de los cítricos (\pm EE), con un intervalo de confianza del 95%, Las letras diferentes sobres las barras indican diferencias significativas.

Bionsayo 2. Confrontación de hongos entomopatógenos sobre medio artificial.

Los hongos entomopatógenos en confrontación con *Beauveria bassiana* (cepa B6C) sobre medio PDA, mostraron diferentes valores de crecimiento radial para cada tratamiento. El valor promedio del control (solo *B. bassiana*) fue de 0.89 mm/día, mientras que en presencia de *Isaria fumosorosea* fue 0.74 mm/día y finalmente con la presencia de *Metarhizium brunneum* se obtuvo 0.94 mm/día (Figura 13), siendo este último valor promedio más alto. De acuerdo al análisis de varianza no muestra diferencia significativa entre los tratamientos. $F_{2,33} = 2.145$, $P = 0.133$ (Cuadro 8). Posteriormente el análisis por la prueba de Tukey genera un solo grupo acomodado las medias en forma ascendente, grupo en el cual, reafirma que no presenta diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de confrontación sobre medio artificial PDA (Cuadro 9). *Beauveria bassiana* (solo) obtuvo un crecimiento ligeramente menor en comparación con *Metarhizium brunneum*, siendo este el caso donde se desarrolló mayormente.

Cuadro 8. Analisis de varianza del crecimiento radial diario de *Beauveria bassiana* en interacción con *I. fumosorosea* y *M. brunneum* sobre medio PDA.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.269	2	.135	2.145	.133
Intra-grupos	2.073	33	.063		
Total	2.342	35			

FV: Fuente de variación; gl: Grado de libertad; F: F calculada.

Cuadro 9. Subconjuntos de los tratamientos en confrontación resultados de la prueba de Tukey (IC 95%).

Tratamientos	N	Subconjuntos alfa 0.05
		1
Control <i>Beauveria</i>	12	.891667 A
<i>Beauveria</i> vs <i>Isaria</i>	12	.738333 A
<i>Beauveria</i> vs <i>Metarhizium</i>	12	.941667 A
<i>p</i>		.131

Letras diferentes indican diferencias significativas entre los subconjuntos.

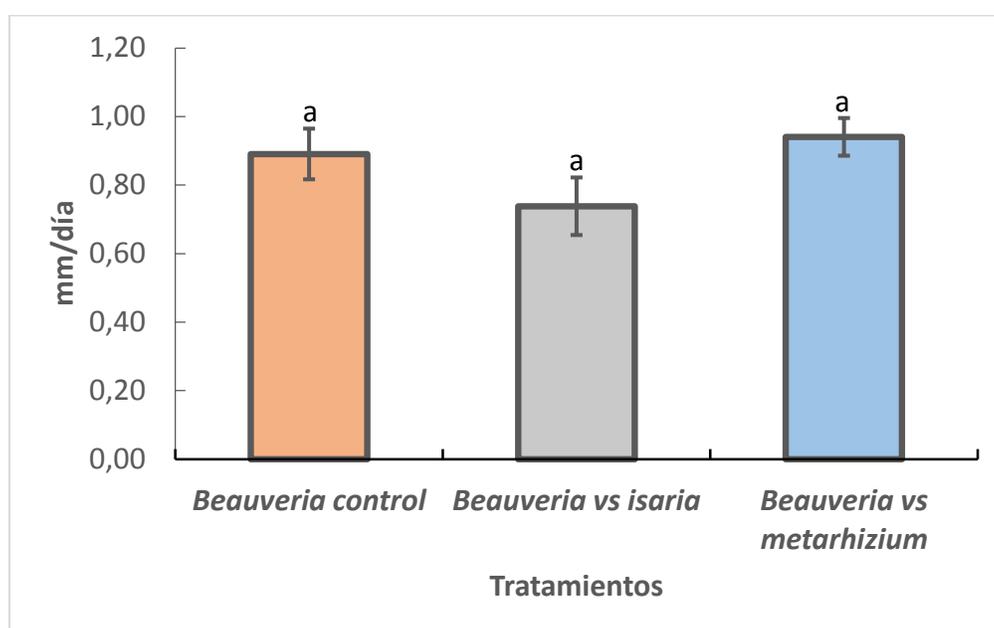


Figura 13. Medias de crecimiento radial diario (\pm EE), por *Beauveria bassiana* y confrontaciones *in vitro*. Las letras similares indican que no hay diferencia significativa entre cada tratamiento, de acuerdo a la prueba de Tukey.

DISCUSIÓN

Se enfocó en esta investigación el uso de hongos entomopatógenos como alternativa de control para insectos plaga como *Diaphorina citri* Kuwayama, con el objetivo de encontrar especies con un grado de patogenicidad eficiente en la disminución de poblaciones sobre huertas de cítricos, además de disminuir el uso irracional de insecticidas químicos sobre e incrementar la sustentabilidad de la agricultura (Góngora et al., 2009). *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin cepa B6C fue utilizada en esta investigación, además de un mix de tres hongos entomopatógenos: *Isaria fumosorosea* Wise, *Metarhizium brunneum* Petch y *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill; con una concentración de 1.3 y 1.4×10^8 conidios mL^{-1} respectivamente.

Los datos mostrados en esta investigación sugieren a *Beauveria bassiana* como auxiliar en el combate del PAC con 40 % de mortalidad sobre los insectos, mientras que Patt et al (2015), demostraron sobre condiciones de invernadero y un método de autodiseminación lograron una mortalidad de 46 %, mientras que Ordoñu-Cruz et al (2015), logró el 100 % de mortalidad sobre *D. citri* seleccionando cepas *in vivo*. La cepa B6C sobre esta prueba de campo, en donde no existen factores controlables en comparación a los otros estudios comparados demostró resultados favorables en la mortalidad del PAC.

Los tratamientos evaluados en campo sobre los psíidos muertos por *B. bassiana* se obtuvo una esporulación de 27%, mayor que el mix de los hongos entomopatógenos. Esta cepa obtuvo condiciones favorables para causar septicemia sobre los insectos del PAC, aunque Sánchez-Lara (2012), demostró que existen aceites minerales que mejoran el desempeño de *Beauveria bassiana*. Se pueden mejorar la efectividad de la cepa utilizando coadyuvantes o como lo muestra Victoriano (2013), realizando aplicaciones de ultra bajo volumen en repetidas ocasiones.

Existe poca información sobre el comportamiento de hongos entomopatógenos interactuando entre ellos desconociendo las formulaciones posibles que se pudieran realizar. Morales-Reyes et al, (2014) demostraron datos *in vitro* sobre hongos entomopatógenos y su comportamiento e interacción en confrontación. *Beauveria bassiana* en el segundo bioensayo realizado muestra que no existen inhibición al ser mezclado con otros hongos entomopatógenos. El comportamiento obtenido medido a través de crecimiento radial diario fueron los siguientes: *Beauveria bassiana* (solo) creció 0.89 mm/día, *B. bassiana* en confrontación de *Isaria fumosorosea* obtuvo 0.74 mm/día y por último *B. bassiana* vs *Metarhizium brunneum* obtuvo 0.94 mm/día. Siendo este último el mayor crecimiento radial registrado. No existe problemática en formularse con otros hongos entomopatógenos o nemátodos entomopatógenos como lo presenta Wu et al (2014), obteniendo interacciones sinérgicas.

Los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico son utilizados cada día más, lo que permite seguir realizando investigaciones para mejorar el desempeño y reducir el uso de plaguicidas químicos en mejora del medio ambiente.

CONCLUSIÓN

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (cepa B6C), fue eficiente en el bioensayo realizado, lo que indica que es una buena herramienta en un programa de manejo integrado del psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*); además, es un hongo que no presenta antagonismo ni decadencia de su acción patogénica sobre el insecto al ser formulado con otros hongos entomopatógenos. Se mantendrá la búsqueda por generar más información que nos ayude a complementar la presente investigación, obteniendo datos más precisos en esta área de estudio.

LITERATURA CITADA

- Ainsworth G. C. 1973. Agostino Bassi, (1773-1856). *Nature* 177: 255-257.
- Alemán, J., Baños, H. y Ravelo, J. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad Huanglongbing: una combinación destructiva para la producción citrícola. *Rev. Protección Veg.* 22(3). 154-165 pp. Cuba.
- Ames, De I.T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Editorial Cañedo. 60 pp. Perú
- Bellis, G., Hollis, D. y Jacobson, S. 2005. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), and Huanglongbing disease do not exist in the Stapleton Station area of the Northern Territory of Australia. *Australian J. Entomol.* 44: 68-70.
- Blasco, J.M., Qureshi, J.A., Urbaneja, A. y Stansly, P.A., 2012. Predatory Mite, *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae), for Biological Control of Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist.* 95(2) 278-284 pp. USA.
- Bové, J. M. 2006. Invited review huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology.* 88(1), 7-37 pp. Brazil.
- Burckhardt, D., and Ouvrard, D. 2012. A revised classification of the jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea). *Zootaxa.* 3509: 1-34.
- Bustillo, A. y Posada, F. 1986. Patogenicidad de un aislamiento de *Nomurea rileyi* sobre larvas del cogollero de maíz *Spodoptera frugiperda*. *Revista colombiana de entomología.* 12(1). 6-15. pp. Colombia.

- Bustillos, A. 2001. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: Seminario sobre uso de entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá. p: 152-155.
- Carrillo, R. M.T., Blanco, L. A. 2009. Potencial y Algunos de los Mecanismos de Acción de los Hongos Entomopatógenos para el Control de Insectos Plaga. Acta Universitaria Vol. 19, Núm. 2, 40-49 pp. México.
- Casique-V. R., 2010.- Evaluación de hongos entomopatógenos y sus formulaciones contra el Psílido Asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama.- Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.
- Clarkson, J. and Charnley, K. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. Trends in microbiology. 4(4). 197-203 pp. USA.
- Cocco, A. and Hoy, M. 2008. Toxicity of Organosilicone Adjuvants and Selected Pesticides to the Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae) and Its Parasitoid *Tamarixia radiata* (Hemiptera: Eulophidae). Florida Entomologist. 91: 610-620.
- Coelho, M. V. y Marquez, A. 2002. "Citrus greening" Uma bacteriose quarentenária que representa ameaça potencial a cotricultura brasileira. Comunicado Técnico 58. Ministerio de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 4 pp.
- Compendio de Protección-Ficha de HLB. 2007. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (SINAVEF), Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP).
- De la Torre, M., Flores M.A., Pucheta, D.M., y Rodríguez, N.S., 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Intercadencia. 31(12). Venezuela.

- Díaz, P.A., Flores, M.A., Navarro, R.S. y De La Torre, M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia* vol. 31(12). 856- 860. pp. Venezuela.
- Fernández, M. y Miranda, I. 2005. Comportamiento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Parte I: Características Morfológicas, Incidencia y Enemigos Naturales Asociados. *Revisión de Protección Vegetal*. 20: 27-31.
- Folimonova, S. Y., D. S. Achor. 2010. Early Events of Citrus Greening (Huanglongbing) Disease Development at the Ultrastructural Level. *Phytopathology*, 100 (9) 949-958.
- Floyd, J. and C. Krass. 2006. Candidatus *Liberibacter africanus*, *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. americanus*. Huanglongbing, citrus greening disease. In: *New Pest Response Guidelines*. USDA APHIS PPQ Emergency and Domestic Programs.
<http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/ppq_manuals.html>
[Consulta 15 de Enero del 2016]
- Fonseca, O., Valera, N. y Vásquez C. 2007. Registro y ciclo de vida de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en tres hospedero en el estado Lara Venezuela. *Entomotrópica*. 22(3). 145-152 pp. Venezuela.
- Fujikawa, T., Miyata, S.-I., Iwanami, T., 2013. Convenient detection of the citrus greening (Huanglongbing) bacterium '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' by direct PCR from the midrib extract. *PLoS One* 8 (2), e57011, online in:
<<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057011>>
- García, G.D. 2012. Fluctuación poblacional de *Diaphorina citri* Kuwayana en limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka). En la sabana de Huimanguillo, Tabasco. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en ciencias. Colegio de posgraduados. 22 pp. México.

- Gatling, H.D. 1970. Distribución de los vectores psílidos de citrus greening enfermedad, con notas sobre binomia y biología de *Diaphorina citri*. PI.Prot.Bull. 18:1. 8-15 pp.
- Grafton-Cardwell, E., Godfrey, K., Rogers, M., Childers, C. and Stansly, P. 2006. Asian Citrus Psyllid. ANR Publications 8205, (En línea). Disponible en <<http://www.anrcatalog.ucdavis.edu>> (Consulta: 20-9-2015) of Florida citrus. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, University of Florida.
- Goettel, M. S. and English, G. 1994. Fungi:Hyphomycetes. pp. 214-223 In: L. Lacey (Ed). Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press. P 409.
- Góngora, B. C., Marín, M. P., Benavides, M. P. 2009. Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como control biológico de la broca del café. Avances técnicos, Cenicafe 384.
- 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.
- Hajek, A.E, Leger, R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hoast. Annual Review of Entomology. 39. 293-322 pp. USA.
- Halbert, S. E. and Manjunath, K. L. 2004. Asian Citrus Psyllid (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. Florida Entomologist 87 (3): 330-353.
- Hong, W. 2003. Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Insect-cuticle degrading enzymes and Development of a new selection marker for fungal transformation. Submitted to the Combined

Faculties for the Natural Sciences and for Mathematics of the Ruperto-Carola University of Heidelberg, Germany for the degree of Doctor of Natural Sciences. 132 pp. Germany.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2010. Catálogo General de Localidades. [<http://mapserver.inegi.org.mx>, 9 julio 2010], México.

Jagoueix, S., Bové, J., Garnier, M. 1996. Techniques for the Specific Detection of the Two Huanglongbing (Greening) Liberibacter species: DNA/DNA Hybridisation and DNA Amplification by PCR. In: Proc. of 13th Conf. of the Int. Org. of Citrus Virologists. Da Graca, J. V., Moreno, P., Yokomi, R. K. eds. Riverside, CA. 384-387

LaFlèche D., Bové J. M. 1970. Structures de Tyep Mycoplasme Dans Les Feuilles de Orangers Atteints de la Maladie du Greening. C. R. Acad. Sci. Ser. D 270: 455-465.

López-Arroyo, J.I., J. Jasso, M.A. Reyes, J. Loera-Gallardo, E. Cortez-Mondaca, M.A. Miranda. 2008. Perspectives fog biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Mexico. In: Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing, Abstract 11.8. USDA, University of Florida. Orlando Florida.

López-Collado, J. 2015. Huanglongbing en México. CONACYT-SAGARPA. [En línea] disponible en < <https://sites.google.com/site/diaphorina/hlb> > [Consulta: Noviembre 2015].

GaMeyer, J.M., y Hoy, M.A 2007. Low incidence of *Candidatus liberibacter asiaticus* in *Diaphorina citri* (hemiptera: psyllidae) populations between Nov. 2005 and Jan 2006: relevance to management of citrus greening disease in Florida. Florida Entomologist 90(2) 394-397 pp. USA.

- Martínez-Carrillo, J. L. y Cortéz-Mondaca. 2008. El Psílido Asiático de los Cítricos *Diaphorina citri* amenaza la producción cítrica de México. Memoria de XI Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas. [Disponible en línea en: <UABC.HTTP://JLMCENTOMOLOGO.BLOGSPOT.COM/2010/04/DIAPHORINA-CITRIKUWAYAMA.HTML>] Consulta 15 Diciembre de 2015
- Méndez, L. Y. 1990. Control microbiano de la broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) con el hongo *Beauveria bassiana* (Bals. J Vuill.) (Deuteromycetes) en el soconusco, Chiapas. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Posgraduados. Montecillos, México.
- Miranda-Salcedo, M. A. y López-Arroyo, J. I. 2009. Ecología del Psílido Asiático de los Cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en Michoacán. P 55. En: Memorias del XXXII Congreso Nacional de Control Biológico, Villahermosa, Tabasco, México.
- Morales-Reyes, C., Sánchez-Pedraza, F., Rodríguez-Contreras, J. A. and Sanchez-Peña, S. Confrontation bioassay between entomopathogenic fungi: Behavior and growth. Proceedings of the 62nd Annual Meeting of the Entomological Society of America. Portland, Oregon. [En línea] disponible en <<https://esa.confex.com/esa/2014/webprogram/Paper88031.html>> [Consulta 05 Enero 2016].
- Mondaca, C.E., Lugo, A.N.E., Pérez, M.J. y Miguel Ángel Apodaca, S.M.A. 2010. Primer Reporte de Enemigos Naturales y Parasitismo Sobre *Diaphorina citri* Kuwayama en Sinaloa, México Southwestern Entomologist, 35(1). 113-116 pp. México.
- Nicholls, E C.I. 2008. Control Biológico de Insectos: Un Enfoque Agroecológico. Editorial Universidad de Antioquia. 261 pp. Colombia.
- Orduño-Cruza, N., Gúzman-Francoa, A. W., Rodríguez- -Leyvaa, E., Alatorre-Rosasa, R., Mora-Aguilerab, G. 2015. In vivo selection of entomopathogenic

fungal isolates for control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Biological Control*. Vol 90. P 1-5.

Joseph M. Patt, J. M., Chowb, A., Meikle, W. G., Graciab, C., Jackson, M. A., Florese, D., Sétamoub, M., Dunlap, C. A., Averyf, P. B., Huntera, W. B., Adamczyk, J. J. 2015. Efficacy of an autodisseminator of an entomopathogenic fungus, *Isaria fumosorosea*, to suppress Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, under greenhouse conditions. *Biological Control*. Vol 88. pp 37-45

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.

Peña, J., Mannion, C. M., Ulmer, B. J. y Halbert, S. E. 2006. Jackfruit, *Antocarpus heterophyllus*, is not a host of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Puerto Rico. *Florida Entomol.* 88: 123-128.

Quintero, Z.I. 1998. "Producción de esporas de *Paecilomyces fumosorosea*. En diferentes medios de cultivo líquidos " T E S I S " presentada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de ciencias Biológicas. 27pp. México.

Rehner, S. 2005. A *Beauveria* Phylogeny Inferred from Nuclear ITS and EF1- α Sequences: Evidence for Cryptic Diversification and Links to cordyceps teleomorphs. *Mycologia*, 97(1): 84-98.

Robles-Gonzalez, M. M; Velázquez-Monreal, J. J; Manzanilla-Ramirez, M. A; Orozco-Santos, M; Medina-Urrutia, V. M; Lopez-Arrollo, I; Flores-Virgen, R. 2013. Síntomas del Huanglongbing (HLB) en árboles de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle) y su dispersión en el estado de

Colima, México. Revista Chapingo Serie Horticultura. Vol. 19. N.1. pp. 15-31.

Rodríguez, P. M., Cambero, C.J., Robles, B.A., Carvajal, C. y Estrada, V. O. 2012. Natural enemies associated to *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) in *Citrus latifolia* Tanaka, in the state of Nayarit, Mexico. *Acta Zoológica Mexicana* 28(3). 625-629 pp. México.

Rodríguez, A. & E. Del Pozo. 2003. Aislamiento de hongos entomopatógenos y evaluación de su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* (west). *Agrociencia*. 7(2): 71-78.

Sagaram, U.S., K. M. DeAngelis, P. Trivedi, G. L. Andersen, S. E. Lu, and N. Wang. 2009. Bacterial Diversity Analysis of Huanglongbing Pathogen-Infected Citrus, Using PhyloChip Arrays and 16S rRNA Gene Clone Library Sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, VOL 75, p. 1566–1574.

Samson, R.; H. Evans & J. Latge. 1988. Atlas of Entomopathogenic fungi. Springer-Verlag, Berlín. 300pp.

Samsinakova, A., Misikova, S., Leopold, J. 1971. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 18:3. 233-330 PP. USA.

Sánchez-Lara, B. M. 2012. Evaluación de *Beauveria bassiana* en Formulaciones no Convencionales para el control de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. 50 p.

Sánchez-Peña, S. R., Casique-Valdez, R., Sánchez-Lara, B. M., Ek-Mass, J.N., Hernández-Guerra, C., Cuerti-Diaz, S. A., Loredó-Salazar, X., López-Arroyo, J. I. 2011. Aplicación en campo de hongos entomopatógenos para

el control de *Diaphorina citri* en Martínez de la Torre, Veracruz, México. Memoria segundo Simposium para el manejo del psílido asiático de los cítricos y el Huanglongbing en México. 245-346 pp. México.

Serena, G.D.C. 2009. Distribución geográfica de *Diaphorina citri* Kuwayana. SENASA. 8 pp. Argentina.

Sosa, A.J.M., López, M.V., Alia, T.I., Hernández, F.A.D. y Jiménez, G.D. 2011. Fluctuación poblacional del psílido asiático de los cítricos. *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), en 3 huertas de cítricos en el estado de Morelos. Segundo simposio nacional sobre investigación para el manejo del psílido asiático de los cítricos y el HUANGLONGBING en México. 141-146 pp. México.

Srinivasan, R. M., Hoy, M., Singh, R., Rogers, M. E. 2008. Laboratory and Field Evaluations of Silwet L-77 and Kinetic Alone and Combination with Imidacloprid and Abamectin for Management of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Florida Entomologist. 91: 87-100.

Subandiyah, S., Nikoh, N., Tsuyumu, S., Somowiyarjo, S. y Fukatsu, T. 2000. Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). Zool. Science. 17: 983-989.

Taba, S., Nasu, K., Takaesu, K., Ooshiro, T., Moromisato, Z. 2006. Detection of Citrus Huanglongbing Using an Iodo-Starch Reaction, The Science Bulletin of the Faculty of Agriculture, University of Ryukyus, 53: 19-24.

Teixeira, D. Sheth, U. Valencia-Sanchez, M.A. Brengues, M. Parker, R. 2005. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. RNA. Abstract 11(4):371-82 In: <<http://www.yeastgenome.org/reference/S000080828/overview>>.

- Trujillo, A. J. 2010. Situación actual, Regulación y Manejo del HLB en México. Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA-SAGARPA. En: Memoria de Taller de Mérida.
- Tsai, J.H. y Ying, H, L. 2000. Biología de *Diaphorina citri* (Homóptera: Psyllidae) en cuatro plantas hospedantes. *Journal of Economic Entomology*. 93(6) 1721-1725 pp. USA.
- Victoriano, M. 2013. Extractos Nutritivos en la Producción de Hongos Entomopatógenos de *Diaphorina citri*, y Aplicación de *Metarhizium brunneum* contra Psílidos Plaga. Tesis de Ingeniero en Agrobiología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México.
- Villanueva, J.J.A., Cabrera, M.H., Aguilar, R.L., Jose, P.R., Canela, C.J.J., Wenninger, E.J. y Hall, D.G. 2008. Patrones diarios y estacionales de color abdominal en *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Sociedad Entomológica de América*. 101(3) 1721-1725 pp. USA.
- Wu, S., Youngman, R. R., Kok, T. K., Laub, A. C., Pfeiffer G. D. 2014. Interaction between entomopathogenic nematodes and entomopathogenic fungi applied to third instar southern masked chafer white grubs, *Cyclocephala lurida* (Coleoptera: Scarabaeidae), under laboratory and greenhouse conditions. *Biological Control*. Volume 76. p 65-73.
- Yang, Y., Huang, M., Andrew, G., Beattie, C., Xia, Y., Ouyang, G., Xiong, J. 2006. Distribution, Biology, Ecology and Control of the Psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama a Major Pest of Citrus: A Status Report for China. *International Journal of Pest Management*. 52: 343-352.
- Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Technol*. 17, 553-596.