

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Evaluación de *Beauveria bassiana* en Formulaciones no Convencionales para el Control de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae)

Por:

**BRAULIO MANUEL SÁNCHEZ LARA**

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

Evaluación de *Beauveria bassiana* en Formulaciones no Convencionales para el  
Control de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae)

Por:

**BRAULIO MANUEL SANCHEZ LARA**

Tesis

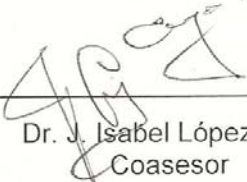
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**


Aprobada



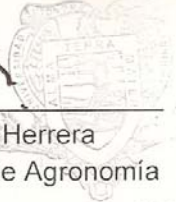
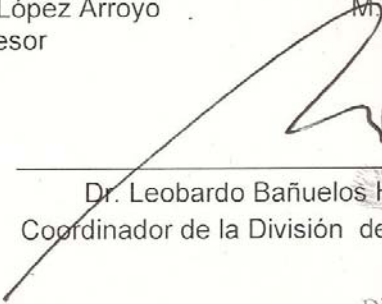
Dr. Sergio René Sánchez Peña  
Asesor Principal



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

Junio, 2012

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios, por darme la dicha de vivir, por darme la fuerza e iluminar mi camino para poder lograr mi objetivo en estos momentos.*

*A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por abrirme las puertas y la oportunidad de crecer profesionalmente, porque no me equivoque en escoger esta carrera de la que estoy orgulloso de ella.*

*Al Dr. Sergio Sánchez Peña, por brindarme su valioso tiempo y apoyo en la realización de esta tesis y por todas las enseñanzas recibidas.*

*Al Dr. Isabel López Arroyo, al dedicarle tiempo en la revisión de este trabajo y por el apoyo para la realización de este proyecto de investigación.*

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

*A la M.C. Rebeca Casique Valdéz, por brindarme todo su apoyo al colaborar en su proyecto para la realización de esta investigación, por su amistad, comentarios y correcciones.*

*A los profesores que me dieron clases, por todos los conocimientos que me brindaron para mi formación, siempre les estaré muy agradecidos.*

## DEDICATORIAS

*A mis Padres:*

*José Melquiades Sánchez Palacios*

*y*

*Eutiquía Lara Palacios*

*A los que siempre les voy estar muy agradecidos, por mí existir y por darme todo ese cariño, cuidado y apoyo. Por nunca dejarme solo, por haberme dado una profesión y por hacerme un hombre de bien a pesar de la distancia.*

*A mis hermanos:*

*Juventino, Filogonio, José Luis, Estela y Rogelio.*

*Quienes me han acompañado durante el transcurso de mi vida, por los momentos de felicidad, tanto en las buenas como las malas, quienes han sido mi motor día con día.*

*A María Luisa.*

*Por su amor y comprensión en estos dos años, por todos los momentos agradables que me has regalado gracias amor.*

*A mis compañeros y amigos: Eduardo, Jonathan, Julio, Oscar, Octavio, Emanuel, José Luis, Raúl, Sandra, Nashelí, Verónica y José Gabriel.  
Por su amistad y momentos gratos.*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	III
DEDICATORIAS .....	IV
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	V
ÍNDICE DE TABLAS .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT .....	X
INTRODUCCIÓN.....	1
Los cítricos .....	2
Objetivo General.....	3
Hipótesis .....	3
REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
<i>Diaphorina citri</i> , Psílido Asiático de los cítricos.....	5
Importancia de la plaga .....	5
Clasificación taxonómica del Psílido Asiático de los Cítricos <i>D. citri</i> Kuwayama.....	7
Caracterización y descripción de <i>Diaphorina citri</i> (Kuwayama).....	7
Adulto .....	7
Huevos .....	8
Ninfas .....	8
Biología y ecología de <i>Diaphorina citri</i> .....	9
Antecedentes y distribución del Huanglongbing (HLB) .....	10
Experiencias en el manejo del HLB en otros países. ....	11
Vectores que transmiten la enfermedad.....	12
Medidas de control para <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama .....	13
Monitoreo del psílido.....	13
Alternativas de control .....	15
Control biológico.....	15
Insectos depredadores .....	15
Parasitoides.....	15
Control químico.....	16

Los hongos entomopatógenos .....	17
Formulaciones .....	18
Descripción del hongo <i>Beauveria bassiana</i> .....	19
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. ....	19
Incidencia Natural.....	20
Clasificación Taxonómica de <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin. ....	20
Modo de acción de los hongos Entomopatógenos .....	21
Influencia de las condiciones ambientales .....	22
MATERIALES Y MÉTODOS. ....	25
METODOLOGIA.....	25
1) BIOENSAYOS CON <i>Tenebrio molitor</i> EN LABORATORIO .....	26
2) BIOENSAYO CON <i>D. citri</i> EN LABORATORIO .....	27
Colecta de adultos de <i>D. citri</i> para bioensayo en laboratorio.....	27
Condiciones del Bioensayo .....	27
3) APLICACIÓN EN CAMPO (INIFAP, CAMPUS IXTACUACO, VERACRUZ MÉXICO), DE <i>B. bassiana</i> EN DOS FORMULACIONES: EMULSIÓN (ACEITE MINERAL PURESPRAY AL 0.5% ) Y EN TWEEN (0.025%). ....	29
Colección de datos.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
1) Bioensayo con <i>Tenebrio molitor</i> .....	32
Comparación de medias en la mortalidad del <i>T. molitor</i> por <i>B. bassiana</i> en diferente formulación.....	33
2) Bioensayo con <i>D. citri</i> en laboratorio.....	34
3) Aplicación de formulaciones de conidias de <i>B. bassiana</i> en campo (Veracruz) .....	36
CONCLUSIONES.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	39

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formulaciones y concentraciones, contra <i>T. molitor</i> .....	27
Tabla 2. Formulaciones hechas contra <i>D. citri</i> .....	29
Tabla 3. Formulaciones llevadas a campo.....	31
Tabla 4 . ANVA obtenida de los resultados del bioensayo con <i>Tenebrio molitor</i> . .....	32
Tabla 5. Análisis de varianza (ANVA), obtenida del bioensayo con <i>D. citri</i> en el laboratorio. 34	
Tabla 6. ANVA de los resultados obtenidos y realizados en campo.....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1. Distribución mundial de <i>Diaphorina citri</i> . Fuentes: Grafton-Cardwell <i>et al.</i> 2006. García-Darderes, C.S. 2009.....	4
Ilustración 2. Planta ornamental muy común conocida como Mirto: <i>Murraya paniculata</i> .....	5
Ilustración 3. Ciclo de vida de <i>D. citri</i> .....	10
Ilustración 4. Estrategias de manejo del HLB en el mundo.....	12
Ilustración 5. Fotografía tomada por H. Gomez-USDA, síntomas del HLB en las hojas. Se observa clorosis, amarillamiento y deformación de la hoja. ....	13
Ilustración 6. Estructura y composición de la cutícula del insecto y esquema de la penetración por hongos entomopatógenos (Duperchy, 2003).....	22
Ilustración 7. Recipiente acondicionado contenedor de <i>Diaphorinas</i> tratadas por el hongo. ....	28
Ilustración 8. Comparación de medias de bioensayo <i>T. molitor</i> . ....	33
Ilustración 9. Bioensayo con <i>D. citri</i> en laboratorio.....	35
Ilustración 10. Porcentaje de esporulación del hongo <i>B. bassiana</i> con cada una de las formulaciones.....	37



## RESUMEN

La dificultad que ha existido en el manejo del psílido Asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), ha incrementado la problemática que representa el insecto para la citricultura mexicana; por tal motivo, existe la necesidad imperiosa de disponer de alternativas para su control, como lo es el uso del control biológico mediante la utilización de hongos entomopatógenos. En el presente estudio se evaluó la aplicación del hongo *Beauveria bassiana* contra ninfas de *Diaphorina citri* en una huerta de limón, en Martínez de la Torre, Veracruz. La producción masiva del hongo *B. bassiana* se produjo en condiciones de laboratorio mediante la siembra de conidias en arroz precocido y esterilizado. La cosecha de conidias se obtuvo fraccionando las semillas de arroz unas con otras dentro de una bolsa de malla antipulgón. Para la aplicación del hongo se evaluaron diferentes formulaciones (aceite vegetal, Tween 20, tierra de diatomeas, talco y savia de nopal) en laboratorio, las cuales produjeron porcentajes de infección superiores a 90%, misma que fue obtenida en la formulación realizada con aceite vegetal contra *D. citri* y *Tenebrio molitor*. En campo se aplicó el hongo con ayuda de una aspersora tipo mochila de motor (STIHL SR-420); con la aplicación dirigida hacia los brotes jóvenes de los arboles de limón. Las aplicaciones indujeron porcentajes de infección de hasta 90% con 2 aplicaciones de conidias del hongo formulado en aceite mineral Pure spray® al 0.5%; con la formulación del hongo en Tween 20 y 2 aplicaciones en campo se obtuvo un 66% de infección. El hongo *Beauveria bassiana* presentó buenos resultados, ya que puede reducir las poblaciones de *D. citri* en campo en un 60 a 90%, dependiendo de la formulación y el vehículo de aplicación; sin embargo, es necesario considerar que para el éxito en el desarrollo de la infección por el hongo se requiere que existan condiciones climáticas que la favorezcan (temperatura y humedad relativa). El empleo de aceite mineral agrícola más agua como vehículo del hongo *B. bassiana*, puede ser una alternativa favorable para proteger el hongo de los rayos UV y favorecer la adherencia en la cutícula del insecto.

Palabras clave: *Diaphorina*, *Beauveria*, Entomopatógenos, formulación.

## ABSTRACT

The effort in the management of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), has increased the problematic that represents the psyllid for the Mexican citriculture; for this reason, there is a persistent need to have alternatives for its control, such as the use of biological control using entomopathogenic fungi. In this study, we evaluated the application of the fungus *Beauveria bassiana* against *Diaphorina citri* nymphs in a lemon orchard in Martínez de la Torre, Veracruz. Mass production of the fungus *B. bassiana* fungus was produced in laboratory conditions by inoculating conidia on sterilized cooked rice. The harvest of conidia was obtained scratching the rice with an antiaphid mesh. For the application of *B. bassiana*, different formulations were evaluated (vegetable oil, Tween 20, diatomaceous earth, talc and cactus sap) in the laboratory, which produced infection rates exceeding 90%, same as was obtained in the formulation made with oil plant against *D. citri* and *Tenebrio molitor*. In the field, the fungus was applied using a backpack sprayer engine (STIHL SR-420), with the direct application to the young shoots of lemon trees. Applications induced infection rates of up to 90% with 2 applications of formulated conidia of the fungus spray ® Pure mineral oil 0.5%, with the formulation in Tween 20 and 2 applications in the field was obtained by 66% infection. The fungus *Beauveria bassiana* showed good results, since it can reduce populations of *D. citri* in field 60 to 90%, depending on the formulation and vehicle application, however, consider that the success in the development of infection by the fungus requires climatic conditions that enhances the development of the fungus (temperature and relative humidity). The use of mineral oil in water emulsion as agricultural vehicle of the fungus *B. bassiana*, may be a favorable alternative to protect the fungus from UV rays and to encourage adherence to the cuticle of the insect.

## INTRODUCCIÓN

El psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), constituye una de las plagas más devastadoras para la citricultura mundial (Bellis 2005). Está presente en México desde 2002 (López-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 y lo que es más grave aún, constituye un eficiente vector de la enfermedad denominada Huanglongbing, que provoca severos daños 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. Las tres formas reportadas actualmente son *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. africanus* y *Ca. L. americanus*. En el continente americano se tienen reportadas las especies *Ca. L. americanus* y *Ca. L. 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).

## Los cítricos

México se encuentra entre los 10 principales productores de cítricos. Ocupa el 2º lugar en la producción de limón después de la India; en 4 º lugar en producción mundial de Naranja, después de Brasil, E.U.A y de la India; y en cuarto lugar en la producción de Toronjas y Pomelos, después de E.U.A, China y Sudafrica. (FAO 2007).

La presencia de *D. citri* en México, se extendió por completo en las zonas citrícolas más importantes del país en un lapso de seis años, lo cual representa una grave amenaza para la citricultura del país debido a su condición de vector del Huanglongbing. Por lo anterior, es necesario efectuar estudios para conocer la fenología del insecto, distribución y épocas de mayor incidencia de poblaciones y daños a los árboles, así como en otras especies de plantas que sean hospederos alternos. Por las características de bajo costo y sustentabilidad, el control biológico de la plaga es fundamental, ya que en otros países invadidos por el insecto, ha mostrado resultados sobresalientes. La obtención, evaluación y formulación de Entomopatógenos para su aplicación extensiva en el control de la plaga, podría constituir una línea básica de investigación por el alto potencial de uso de este tipo de agentes (Meyer *et al.*, 2007).

## **Objetivo General**

Evaluar la efectividad de formulaciones del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para el control de *Diaphorina citri*.

## **Hipótesis**

Se espera que la formulación hecha en aceite, mejora la actividad del hongo *Beauveria bassiana* para el control de *Diaphorina citri*.

## REVISIÓN DE LITERATURA

El psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), es una de las plagas más serias de los cítricos a nivel mundial (Aubert, 1987), que se desarrolla exclusivamente en plantas de la familia Rutaceae. El psílido asiático fue descrito por primera vez en Taiwán en 1907 (Halbert y Manjunath, 2004); actualmente es un insecto plaga con categoría cuarentenaria (OEPP/EPPO, 1988) y actualmente está establecido ampliamente en las zonas citrícolas del mundo (Catling, 1970; Wooler *et al.*, 1974; CABI/EPPO, 2001; EPPO, 2005).

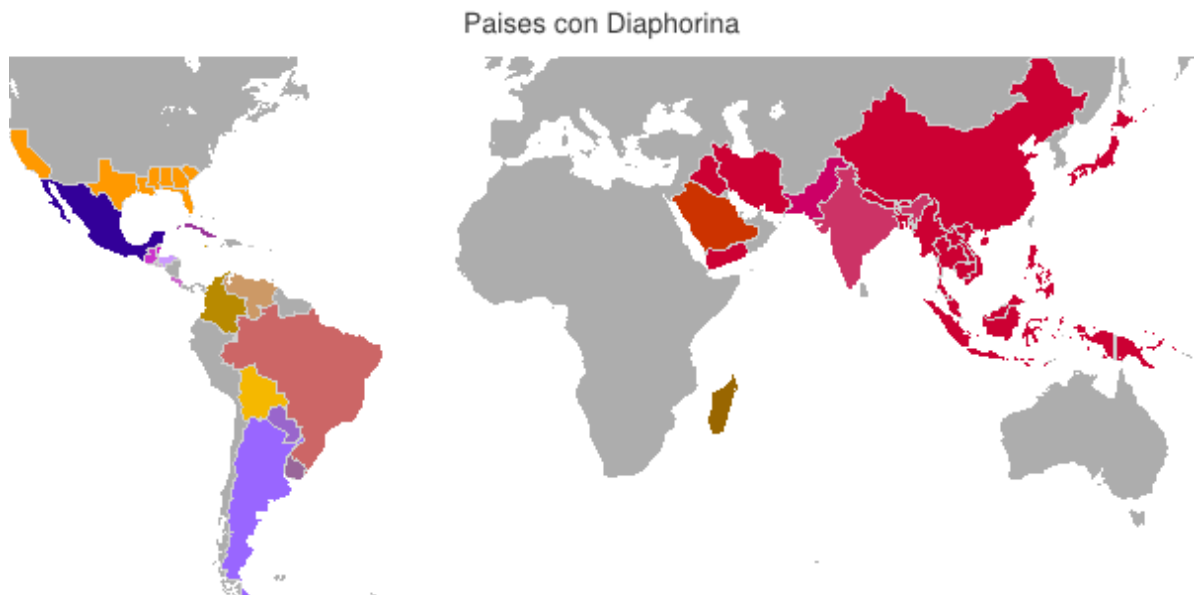


Ilustración 1. Distribución mundial de *Diaphorina citri*. Fuentes: Grafton-Cardwell *et al.* 2006. García-Darderes, C.S. 2009.

*D. citri*, se detectó en México durante el año de 2002 en los estados de Campeche y Quintana Roo. Desde entonces *D. citri* se ha distribuido ampliamente en la mayoría de las áreas citrícolas del país.

### ***Diaphorina citri*, Psilido Asiático de los cítricos**

Las plantas hospederas del insecto se limitan a las rutáceas, tanto las especies silvestres como en los cítricos comerciales, especialmente limones (*Citrus limon*), limón rugoso (*Citrus jambhuri*), naranja agria (*Citrus aurantium*), toronja (*Citrus paradisi*) y limas (*Citrus aurantiifolia*). *Murraya paniculata*, planta rutácea ornamental preferida por *Diaphorina citri* (<http://eppo.org/QUARANTINE>), ver figura 2. Los hospedantes silvestres de *Diaphorina citri* son: *Calodendrum capense*, *Clausena lansium*, *Fortunella*, *Limonia acidissima*, *Murraya paniculata*, *Poncirus*, *Toddalia*.



Ilustración 2. Planta ornamental muy común conocida como Mirto: *Murraya paniculata*.

### **Importancia de la plaga**

El daño directo es causado por las ninfas y adultos al extraer grandes cantidades de savia de las hojas, pecíolos y brotes tiernos, ocasionando deformaciones, enrollamiento y secreción de una mielecilla que favorece la aparición

de la fumagina. La fumagina, es un hongo que afecta el vigor de los árboles al interferir el proceso de la fotosíntesis (Halbert y Manjunath, 2004). La *D. citri* en infestaciones fuertes puede matar los brotes vegetativos en desarrollo o causar la abscisión de hojas (Michaud, 2004). La mayor amenaza del psílido, en cuanto a pérdidas económicas, es al ser vector del Huanglongbing (HLB) o dragón amarillo, cuyo patógeno es *Candidatus Liberibacter* spp.. Es una bacteria restringida al floema, Gram negativa; enfermedad devastadora incluso en mayor grado a la causada por el Virus de la Tristeza de los Cítricos (da Graca, 1991; da Graca y Korsten, 2004; Halbert y Manjunath, 2004; Beattie *et al.*, 2008). (Bové 2006), y es la que ocasiona grandes pérdidas y dificultad para la exportación. Existen tres variantes de esta bacteria, *C. L. asiaticus* , *C.L. africanus* y *C.L. americanus*.

En los árboles infectados por el patógeno los frutos se deforman completamente y resultan inaceptables en el mercado (da Graca, 1991; da Graca y Korsten, 2004; Halbert y Manjunath, 2004). Además, el insecto al alimentarse de la planta introduce sustancias tóxicas que causa malformación de brotes y hojas (Tsai *et al.*, 2002), reducción en el tamaño de la fruta, desarrollo asimétrico, declinación del árbol, aborto de semilla y falta de jugo. *D. citri* es reportada como el vector más eficiente del HLB (Tsai *et al.* 2002). Los adultos y las ninfas de cuarto y quinto instar son capaces de transmitir el patógeno después de 8-12 días (Roistacher, 1991). El psílido Asiático al alimentarse en una planta infectada adquiere el patógeno en 30 min. (Roistacher, 1991). El patógeno se multiplica en el vector para continuar diseminando el patógeno (Aubert, 1987).



## **Clasificación taxonómica del Psílido Asiático de los Cítricos *D. citri* Kuwayama**

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Suborden: Sternorrhyncha

Superfamilia: Psylloidea

Familia: Psyllidae

Género y especie: *Diaphorina citri*

(Triplehorn y Johnson, 2005).

Kuwayama describió a la especie por primera vez en 1907, de especímenes obtenidos en Shinchiku, Taiwán.

### **Caracterización y descripción de *Diaphorina citri* (Kuwayama)**

Los adultos de *D. citri* son saltadores activos. Los huevos son amarillo brillante y son depositados en los brotes recién emergidos. Las ninfas son verdes o anaranjado opaco; se alimentan en hojas y tallos, sin embargo, son más probable de encontrar en brotes nuevos por lo que es posible encontrar incrementos poblacionales durante los periodos de crecimiento activo de la planta.

#### **Adulto**

Hall (2008), reporta medidas de 2.7 a 3.3 mm de largo con alas café moteadas. Cuerpo marrón jaspeado, recubierto de polvo ceroso, cabeza marrón con ojos rojos. 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 les puede reconocer por la posición que adoptan durante la alimentación, donde la cabeza está pegada a la superficie de la hoja, mientras que el extremo distal del cuerpo está levantado, formando un ángulo de 30 a 45° con respecto a la superficie (Halbert y Manjunath, 2004).

### **Huevos**

El tamaño de los huevos aparece en la literatura de 0.31mm de longitud y 0,14 mm de ancho, alargado y de forma oval (Tsai y Liu, 2000), Los huevos son de color amarillo cuando recién son depositados y se vuelven de color naranja brillante con dos manchitas rojas en los ojos cuando maduran. Las hembras son capaces de ovipositar hasta 800 huevos durante toda su vida. (Chavan y Summanwar, 1993). La cantidad de huevos depositados depende de la planta hospedante. Cuando la temperatura es de 25°C la eclosión de los mismos ocurre a los 4 días (Chiou-Nan Chen, 1998, Y.H. y Tsai, H. 2000).

### **Ninfas**

Son sedentarias, forman colonias con un número de individuos variable, hasta cientos. Las ninfas del quinto estadio dan lugar a adultos machos y hembras. Todo el ciclo de vida del insecto toma entre 15 a 47 días, dependiendo de la temperatura (Chavan y Summanwar, 1993). Las ninfas se alimentan de las hojas jóvenes y tallos continuamente secretando grandes cantidades de mielecilla por el ano y una sustancia cerosa filiforme de las glándulas circumanales (Tsai y Liu, 2000).

El primer estadio ninfal es de 0.3 mm de largo y 0.17 mm de ancho con un cuerpo ligeramente rosado y un par de ojos rojos compuestos (Tsai y Liu, 2000). El segundo estadio es de 0,45 mm de largo y 0,25 mm de ancho; son visibles alas rudimentarias en forma de almohadillas en el dorso del tórax. Los promedios del

tercer estadio son de 0.74 mm de largo por 0.43 mm de ancho, hay evidencia de segmentación de antena. El promedio del cuarto estadio es de 1.01mm de longitud y 0,7 mm de ancho, cuenta con dos setas en cada antena (Husain y Nath, 1927). El quinto estadio tiene un promedio de 1,6 mm de largo y 1,02 mm de ancho, hay tres setas en cada antena (Husain y Nath, 1927). Cuando las ninfas maduran, algunas tienen el abdomen verde azulado, en otros se vuelve naranja pálido.

### **Biología y ecología de *Diaphorina citri*.**

El rango óptimo de temperatura para el desarrollo del psílido está entre 25-28°C. (Liu y Tsai 2000). 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). El ciclo de vida del psílido incluye una etapa de huevecillo y cinco estadios de ninfas. Las hembras ponen huevos continuamente durante toda su vida si las hojas jóvenes se encuentran presentes. Los huevos eclosionan en 4 días y las ninfas se desarrollan en un período de 13 días hasta llegar a adulto según lo reportado por Tsai y Liu (2000). 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). El tiempo de generación de la media poblacional a 25°C varía de 22 a 25 días; a 24°C los machos adultos, viven un promedio de 21 a 25 días y las hembras de 31 a 32 días (Nava *et al.* 2007). La longevidad máxima osciló según lo reportado por Tsai y Liu (2000) entre 117 días a 15°C a 51 días a 30°C. La población del psílido fluctúa en relación a la temperatura y la humedad relativa. El psílido aumenta en la población dos veces al año, que coincide con períodos de brotes de los cítricos en primavera y verano (Wang *et al.*, 1996; Sahu & Mandal, 1997).

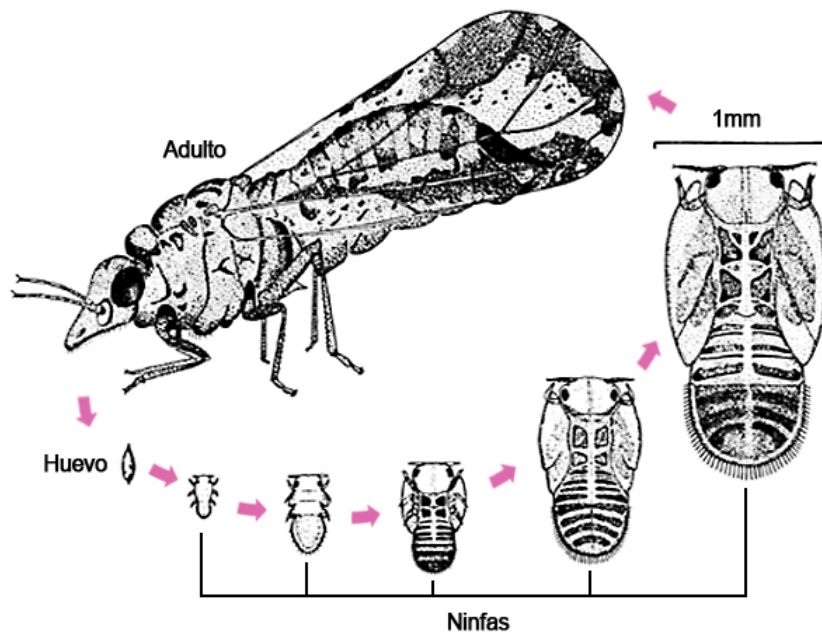


Ilustración 3. Ciclo de vida de *D. citri*.

### Antecedentes y distribución del Huanglongbing (HLB)

El HLB, palabra de origen chino que significa enfermedad del brote amarillo. Es una enfermedad de reciente introducción a México (julio de 2009). Los síntomas que presenta la enfermedad es moteado difuso de las hojas, los brotes se vuelven amarillentos. Las ramas y brotes mueren y se secan; en árboles que tienen una infestación prolongada, el árbol pierde follaje, los frutos no se forman por completo, tienden a caerse y después de un tiempo, el árbol se muere (Polek *et al.*, 2007). En el caso de los frutos, su desarrollo se detiene, en algunos casos los frutos se deforman, tienen una coloración atípica y las semillas son abortivas. El diagnóstico requiere de técnicas moleculares, como es la PCR (Polymerase Chain Reaction) (Su, 2011). Aunque la bacteria se restringe al floema de las rutáceas, tiene la capacidad de multiplicarse en la hemolinfa y las glándulas salivales de los psíidos vectores. 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).

La enfermedad del huanglongbing (HLB) fue detectada por primera vez en Asia (China), a finales del siglo XIX, posteriormente se reportó en África del Sur a principios del siglo XX, lo que propició que a través de los años se diseminara hacia varios países de ambos continentes (Bove, *et al.*, 2008). En Febrero del 2004 se detectó en Brasil. En agosto del 2005, la enfermedad fue detectada también en Florida E. U. A., esto es siete años después de la llegada del vector *D. citri* (Bove, *et al.*, 2008); en 2007 se informa de su presencia en Cuba y en el 2009 en México (Trujillo, 2010).

En México se detectó la *Diaphorina citri* por primera vez en el 2002 en el estado de Yucatán y siete años después se detecta el HLB en ese mismo estado. Los síntomas de la enfermedad a nivel mundial se han detectado principalmente en cítricos dulces, sin embargo en México, los síntomas se han detectado primeramente en limón mexicano. El HLB en México se detectó en el 2009; en Yucatán el mes de julio, semanas después en Quintana Roo y en Noviembre en los estados de Nayarit y Jalisco. En el 2010 la enfermedad se detecto en el mes de Marzo en Campeche, en Abril en Colima y en junio en Sinaloa; de tal forma que en menos de un año, el HLB ya está presente en 7 estados de México (Trujillo, 2010).

### **Experiencias en el manejo del HLB en otros países.**

En países como Brasil, Estados Unidos (Florida) y en otros países, basan el manejo de la enfermedad del HLB en sus huertas de cítricos, en tres estrategias fundamentales que les permite mantener las huertas productivas y convivir con la enfermedad (Bassanezi, 2010); estas estrategias son: 1. Producción de plantas certificadas bajo invernadero, 2. Control del vector y 3. Detección y eliminación de plantas enfermas. (Figura 2).

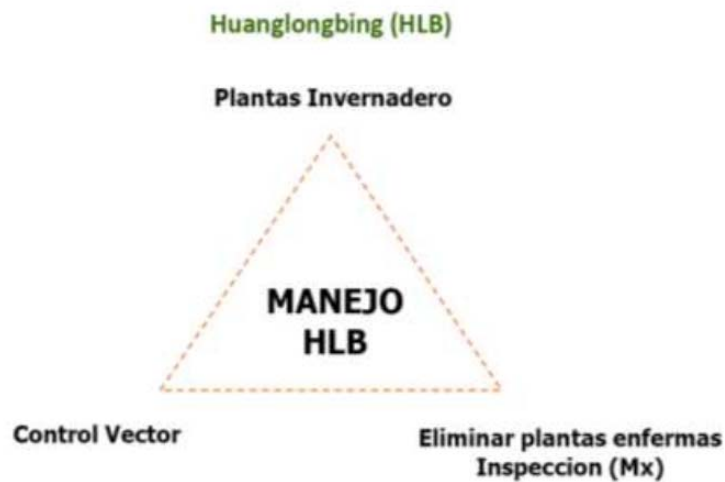


Ilustración 4. Estrategias de manejo del HLB en el mundo

### **Vectores que transmiten la enfermedad**

*Ca. Liberibacter* spp. es una bacteria persistente que se reproduce dentro del insecto (*Diaphorina citri*) pero no se transmite a otras generaciones, de tal forma que la bacteria infecta al vector sin afectar los procesos fisiológicos del insecto, este al alimentarse de la planta transmite la enfermedad. La bacteria circula por el floema de la planta impidiendo la circulación de los nutrientes por el taponamiento de los vasos floemáticos, provocando síntomas típicos de deficiencias nutrimentales en la planta (Da Graca 1991).



Ilustración 5. Fotografía tomada por H. Gomez-USDA, síntomas del HLB en las hojas. Se observa clorosis, amarillamiento y deformación de la hoja.

### **Medidas de control para *Diaphorina citri* Kuwayama**

#### **Monitoreo del psílido**

Se debe monitorear semanalmente y de manera directa, brotes de los árboles, en huertas de traspatio, viveros, zonas urbanas y en huertas comerciales, pero principalmente en las orillas de carreteras o de caminos vecinales. Investigadores de Florida recomiendan la colecta de insectos adultos a una hoja blanca con cuadrícula, mediante tres golpes al brote del árbol. Los adultos son prioritarios debido a que pueden diseminar la enfermedad. Se sugiere que por cada huerta se obtengan 100 muestras.

Los árboles a muestrear deben elegirse al azar cubriendo toda el área de la huerta, tomando muy en cuenta los árboles de las orillas colindantes con huertos vecinos. Se proponen muestrear el 2% de los árboles de cada huerta monitoreada. De cada árbol monitoreado deberán tomarse 2 brotes tiernos que tengan entre 2 y 4 cm de longitud. En caso de que el 20% de los árboles muestreados tengan al menos un brote infestado con ninfas o huevecillos del psílido tendrá que aplicarse medidas de control (Robles *et al.*, 2010). *D. citri*, normalmente predomina en los árboles del

exterior de las huertas, ahí se recomienda realizar el mayor número de observaciones y dirigirse hacia los árboles establecidos en el centro de las huertas, mediante recorridos en zig-zag (Belasque *et al.*, 2010). Deben ser personas capacitadas las que monitorean el psílido y sepan reconocer las diferentes etapas de desarrollo del psílido, lo que se considera como la manera más rápida para la detección de una infestación (Hall, 2008, citado por Robles *et al.*, 2010). Por otro lado Halbert y Manjunath (2004), citados por Díaz (2010), reportan que se requiere de tres ninfas o cinco adultos por brote como máximo, para implementar un programa de control químico (Díaz, 2010).

Otro indicador en la fluctuación de las poblaciones de adultos del psílido es el uso de trampas amarillas (Hall *et al.*, 2007). Por ejemplo las trampas a base de charolas amarillas con una porción de agua jabonosa ó las trampas de papel amarillas tipo cartón, de 20 x 15 cm, que se recubren con algún pegamento transparente. Las trampas deben distribuirse en todo el huerto, principalmente en los árboles de las orillas donde se colinda con huertos vecinos. Se recomienda instalar 10 trampas en predios de 1 a 5 has; 20 trampas en huertos de 6 a 10 has., las cuales deben reemplazarse cada 15 días, para hacer el conteo de adultos capturados (Robles *et al.*, 2010).

En caso de encontrar algún árbol sospechoso, los inspectores marcan el árbol con cinta de color y al final del día reportan al responsable de la brigada. Además, PROCIGO, está monitoreando sus huertas de cítricos mediante trampas amarillas con pegamento, las cuales son instaladas en puntos estratégicos de las huertas, lo que ha favorecido para la toma de decisiones para efectuar aspersiones fuera de las programadas en el año (Lost, 2009).



## **Alternativas de control**

### **Control biológico**

El manejo de este psílido mediante el uso de enemigos naturales como parasitoides, predadores y hongos entomopatógenos, los cuales pueden cumplir una función muy importante para reducir las poblaciones de esta plaga en las huertas de cítricos.

### **Insectos depredadores**

El grupo de especies utilizadas como agentes de control biológico de *D. citri*, varía geográficamente. Los agentes biológicos más importantes para el control de *D. citri*, se incluyen varias especies de coccinélidos (Coleoptera: Coccinellidae); entre las que destacan *Harmonia axyridis* Pallas, *Olla v-nigrum* Mulsant, *Exochomus childreni* Mulsant, *Cycloneda sanguinea* L., *Curinus coeruleus* Mulsant *Coccinella septempunctata* L., *C. rependa* Thunberg, *Cheilomenes sexmaculata* Fab. *Chilocorus nigrita* (Fab.), *Scymnus* spp. (Husain and Nath 1927, Aubert 1987, Gravena *et al.* 1996, Michaud 2001, Michaud 2002, Michaud 2004, Michaud and Olsen 2004), *Brachiacantha decora* e *Hippodamia convergens* (Inifap, 2010); sírfidos (Diptera: Syrphidae), crisopas (Neuroptera: Chrysopidae, Hemerobiidae) y arañas (Aranae) (Aubert 1987, Michaud 2001, Michaud 2002, Michaud 2004, González *et al.* 2003).

### **Parasitoides**

El parasitoide *Tamarixia radiata* es un parasitoide originario de la India, cuyas larvas se alimentan a expensas de las ninfas de *D. citri*. debajo de su cuerpo pupan y tejen un capullo adherido a la superficie de la hoja y emergen a través del integumento del huésped. En Cuba, González *et al.*, (2002) determinaron que *Tamarixia radiata* (Waterson), parasitaba el segundo, tercero y cuarto estadio ninfal de *D. citri*, y concluyen después de tres años de evaluación, que tiene una

efectividad entre 30.7% y 97,3%. En Isla Reunión, *T. radiata*, parasitó entre el 60% a 70% de las ninfas de *D. citri*, mientras que *Diaphorencyrtus aligarhensis* logró parasitar sólo el 20%, que se considera de baja efectividad, debido al hiperparasitismo.

El género *Tamarixia* 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).

### **Control químico**

La selección de un insecticida contra *D. citri*, debe considerarse su eficiencia, período residual, selectividad y en los programas de rotación de los grupos químicos. Con estos enfoques podrá evitarse la resistencia de *D. citri* a los plaguicidas como lo han logrado en Brasil, donde recomiendan hacer rotación de los diferentes grupos químicos (Díaz, 2010). El control químico se dirige principalmente hacia el vivero, plantaciones de fomento y plantaciones jóvenes, puesto que los árboles maduros soportan mejor los daños causados por el vector (Alemán *et al.*, 2007).

### **Productos sistémicos**

El control de *D. citri* en Brasil en huertas en desarrollo, aun sin producción de frutos, se sugiere aplicar productos sistémicos durante los períodos lluviosos, principalmente: Temik, Imidacloprid y Thiamethoxam entre otros; con Imidacloprid ha sido posible el control del 100% de los adultos y 98% de las ninfas (Cáceres, 2002, citado por Díaz, 2009). Los insecticidas sistémicos pueden ser aplicados al tronco de los árboles, al suelo en forma granulada o drenados (“drench”), cuando haya humedad en el suelo y de preferencia unos 15 a 20 días antes de que ocurra la brotación vegetativa.

## **Productos de contacto**

Estos pueden ser utilizados en periodos de sequia, como son: Dimetoato, Ethion, Malathi3n, Piretroides, Carbamatos y Abamectina. (Cobelo, 2005). Para controlar adultos procedentes del exterior de las huertas, para reducir la posibilidad de transmisi3n del HLB. Tienen un buen efecto para disminuir la densidad de poblaci3n del insecto, con un el control de m3s del 80% y una residualidad media de 30 d3as (Yamamoto y Miranda, 2009).

Medidas de control qu3mico como insecticidas (Dimetoato, monocrotofos, fosfamid3n, confidor, decametrina, y fenvalerato), productos vegetales (aceite de neem, aceites en aerosol (petr3leo)) y reguladores del crecimiento de insectos han sido probados contra el ps3lido asi3tico de los c3tricos con resultados alentadores (Ahmed *et al.*, 2004). De dos a 18 tres aspersiones con intervalos de 10 a 15 d3as se han encontrado ser eficaces contra el ps3lido asi3tico de los c3tricos (Dahiya *et al*, 1994; Shivankar *et al.*, 2000). Se acepta que los aceites de petr3leo son m3s efectivos contra insectos peque1os e inm3viles, los cuales quedan cubiertos por una fina pel3cula de aceite y por tanto mueren. Los aceites de petr3leo han demostrado un efectivo control de las ninfas del ps3lido en condiciones de campo y para obtener una mejor protecci3n del cultivo se recomienda su aplicaci3n en intervalos menores de nueve d3as (Rae *et al.*, 1997).

## **Los hongos entomopat3genos**

Etienne *et al.*, (2001), citado por Halbert y Manjunath (2004), se1alaron que es com3n observar al hongo *Hirsutella citriformis* Speare, controlando ps3lidos, cuando la humedad relativa era mayor del 80%. En un estudio realizado en Cuba sobre hongos entomopat3genos, 3lvarez *et al.*, (1994), encontraron en 3rboles de lim3n Mexicano *Citrus aurantifolia* Swingle y en plantas de *Murraya paniculata* (Lin) Jack., ninfas y adultos de *D. citri*, parasitados por *Hirsutella citriformis* Speare, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y *Paecilomyces* sp, 3ste 3ltimo afectando solamente adultos del ps3lido.

En Tuxpan, Veracruz, México, González *et al.* (2008), en el mes de marzo detectaron una tasa de infección del 21.1% por *Hirsutella* spp. Sobre de *D. citri*, cuando se tenía humedad relativa entre 50% a 60%. Los mismos autores, citan que Subandiyah *et al.* (2000) en Indonesia observaron tasas de infección de 82.9% y de 52.2% en los meses de septiembre, febrero y julio, cuando la humedad relativa era mayor del 80% durante los meses de muestreo.

### **Formulaciones**

Los hongos entomopatógenos se encuentran en rastros de cultivos, estiércol, en el suelo, las plantas; logrando un buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol. Por lo que todos los insectos son susceptibles a algunas de las enfermedades causadas por hongos (López y Hans Börjes, 2001). Los hongos entomopatógenos pueden eliminar o mantener las plagas en niveles que no ocasionan daños económicos a los cultivos (Azevedo J.L. y Melo I.S. 1998). Para utilizar hongos entomopatógenos como insecticidas deben producirse cantidades masivas del hongo. Los hongos se han reproducido para su uso como agentes biológicos de plagas desde hace 100 años, para lo cual se ha utilizado diferentes métodos de reproducción. Entre ellos, el uso de sustratos como arroz, trigo y medios líquidos mediante técnicas más sofisticadas (Vélez *et al.*, 1997).

Para ser formulado, la viabilidad del hongo no debe ser menor de 95% y el contenido de humedad entre 4 – 6 %. (Monzón, 2001). Existen adyuvantes mejoran la germinación de las esporas, como es el caso del aceite de maíz sin refinar, que mejora la actividad de *Colletotrichum truncatum* (Schwein) Andrus y Morre y reduce los requerimientos de humedad necesarios para su germinación. Surfactantes como Tween 20 permiten a las plantas a reducir la tensión superficial y mejoran la dispersión de las esporas en las gotas. La formulación de un entomopatógeno consiste en adicionarle determinados compuestos que mejoran su desempeño en el campo, facilitando su manejo, aplicación y permita su almacenamiento, con una

pérdida mínima de las cualidades del producto (Batista, Alves, S., Alves, L., Pereira y Augusto, 1998).

Las propiedades físicas y biológicas de la formulación deben permanecer estables por un tiempo mínimo de 12 meses, pero es recomendable que se mantengan durante 18 meses para permitir su comercialización. Además de mejorar la adhesión a la cutícula del insecto; aumentar o mantener la virulencia y permitir su aplicación con equipos de ultrabajo volumen (Carballo, 1998). El departamento de Control de la Calidad de la firma productora que asegure al usuario un producto de máxima eficacia en condiciones de campo (Vélez, 1997; Carballo, 1998; Monzón, 2001). Algunas pruebas microbiológicas recomendadas son: concentración de esporas: establece la dosificación del producto; germinación de esporas: determina la viabilidad del hongo en la formulación; pureza: revela la proporción del agente biológico en la formulación e identifica los microorganismos contaminantes con el objetivo de mejorar el proceso de producción y formulación de los entomopatógenos.

### **Descripción del hongo *Beauveria bassiana***

#### ***Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.**

El hongo *Beauveria bassiana*, pertenece a los Deuteromicetos y es la forma de reproducción asexual (anomorfo) de la especie *Cordyceps bassiana*. En 1835 el italiano Agostino Bassi de Lodi descubrió un hongo, actualmente conocido como *B. bassiana* atacando al gusano de seda (Driesche y Bellows, 1996), sin embargo, el primer reconocimiento taxonómico fue propuesto por Balsamo-Crivelli en 1912 (Rehner, 2005).

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 ovoides y

unicelulares coincidiendo con las descripciones de Bustillos (2001), Rodríguez y Del Pozo (2003). *B. bassiana* que posee conidias globosas a subglobosas, las estructuras conidióforas forman densos grupos, como lo describe Samson *et al.* (1988). El hongo *B. bassiana* causa una enfermedad se manifiesta primeramente por un crecimiento algodonoso, blanco o harinoso, que en ocasiones envuelve completamente al 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 emergen y cubren el cuerpo con típico crecimiento micelial blanco (Ferrón, 1978, citado por Alfaro, 1995).

### **Incidencia Natural**

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

### **Clasificación Taxonómica de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin.**

Reino.....Fungi  
 Phylum .....Ascomycota  
 Subphylum .....Pezizomycotina  
 Clase ..... Sordariomycetes  
 Subclase.....Hypocreomycetidae  
 Orden..... Hypocreales  
 Familia .....Clavicipitaceae  
 Género y especie ..... *Beauveria bassiana*

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

## **Modo de acción de los hongos Entomopatógenos**

El principal aspecto de la patogénesis del hongo en el huésped, se da directamente a través de la cutícula, partes bucales, membranas intersegmentales o a través de los espiráculos, sitios donde existe alta humedad que promueve la germinación de las esporas y permite la penetración de las hifas. Se considera que estos microorganismos patógenos actúan por contacto, ya que las unidades infectivas (esporas) se adhieren a la superficie de la cutícula a través de fuerzas hidrófobas debido a la presencia de proteínas ricas en cisteínas llamadas hidrofobinas (Charnley 1997, Kershaw y Nicholas 1998, Jeffs *et al.* 1999). Una vez en contacto con la cutícula, el hongo germina y produce un tubo germinativo que empieza a deslizarse sobre la cutícula buscando puntos que faciliten su penetración. La penetración es ayudada por la formación de células apesorales (apesorio) que ejercen presión física sobre el exoesqueleto, además de la producción de enzimas, como proteinazas, quitinazas, lipasas, esterazas que degradan la cutícula (St. Leger 1993, Ferron *et al.* 1991). La penetración es favorecida por efecto de la presión hidrostática y la formación de clavijas que penetran la cutícula del huésped (St. Leger *et al.* 1989). El hongo atraviesa la epicutícula y forma placas que van invadiendo y destruyendo los diferentes estratos. Una vez dentro del hemocele, la colonización del huésped se realiza por medio de blastosporas (un estado de desarrollo tipo levaduriforme) y micelio (St. Leger *et al.* 1991). El hongo invade la hemolinfa, en cuyo caso la muerte es el resultado de una combinación de daños mecánicos producidos por el crecimiento del hongo, desnutrición (el hongo utiliza azúcares y proteínas presentes en la hemolinfa) y por la acción de metabolitos secundarios o toxinas (Gillespie y Claydon 1989, Roberts 1989, Kershaw *et al.* 1999, Chul Kang *et al.* 1999). Después de muerto el insecto, si la disponibilidad de agua es alta los hongos emergen al exterior a través de la cutícula y esporulan sobre el cadáver produciendo inóculo para infectar a otros insectos. Si las condiciones no son favorables, queda dentro del cadáver del insecto, donde puede sobrevivir por algunos meses y eventualmente producirá esporas cuando lleguen las condiciones favorables (Tanada y Kaya, 1993).

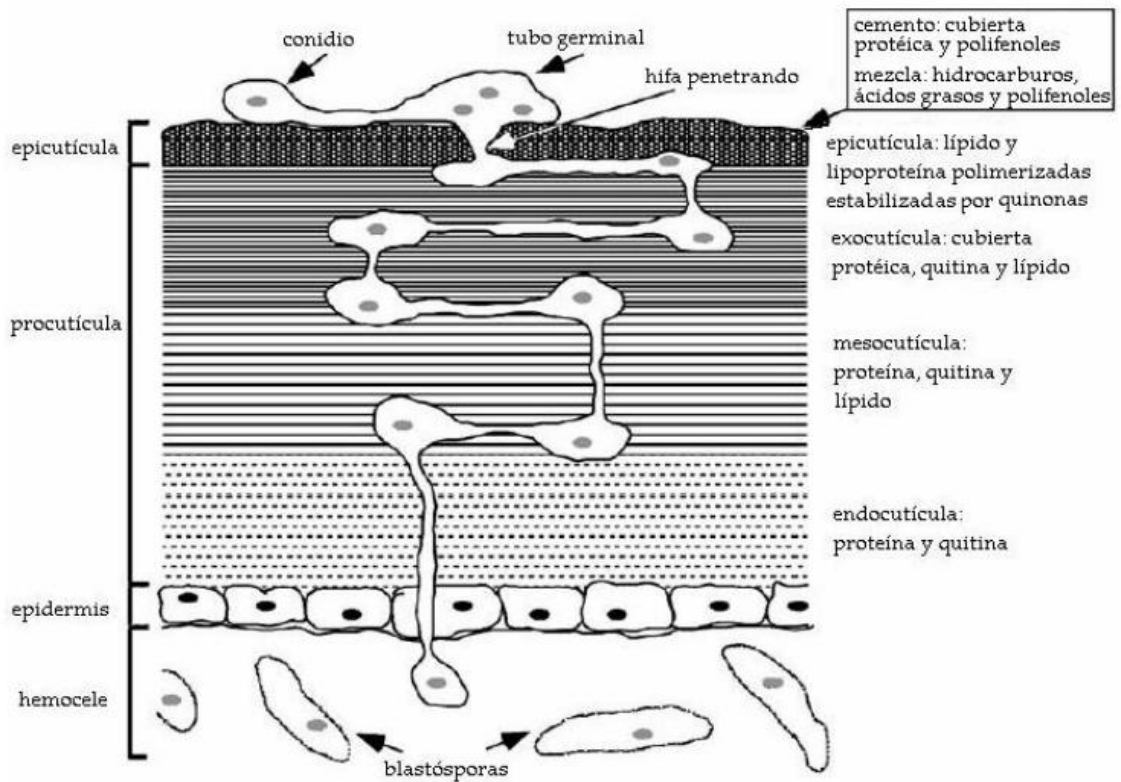


Ilustración 6. Estructura y composición de la cutícula del insecto y esquema de la penetración por hongos entomopatógenos (Duperchy, 2003).

## Influencia de las condiciones ambientales

### Temperatura

El hongo *B. bassiana* se desarrolla a los 15-35 °C de temperatura, sin embargo la óptima para su germinación, crecimiento y esporulación son de entre 20 y 30 °C. (Ramoska, 1984, citado por Alfaro, 1995).

Por lo que es posible seleccionar cepas que puedan emplearse como agentes de control biológico para una zona determinada.

Rosas (1994) cita a Steinhaus (1960), quien encontró que los conidios de *B. bassiana* almacenadas a 8 y 4 °C permanecen viables de 1 a 3 años, en tanto que si se almacenan a 21 °C disminuyen su viabilidad a los pocos meses.



## **Humedad**

Ramoska, (1984, citado por Alfaro, 1995) menciona que el hongo *B. bassiana* se desarrolla a los 92.5% de humedad o más. Sin embargo la óptima para su germinación, crecimiento y esporulación es del 100%. El desarrollo micelial de este hongo sobre insectos muertos se realiza preferentemente en condiciones de alta humedad (92%), lo que explica el desarrollo de epizootias naturales en climas húmedos (Ferrón, 1978; Khan y Rajak, 1986), ya que el inóculo sobre los cadáveres se multiplica solo cuando la humedad relativa del microambiente del hospedero es cercana al punto de saturación. Sánchez (1993), a este respecto comenta que aún en zonas de baja humedad relativa, si al hongo le favorece la humedad que hay en el microclima donde se desarrolla el insecto, aquél es capaz de infectarlo y causarle muerte.

## **Luminosidad**

Los hongos entomopatógenos son muy susceptibles a la inactivación por la radiación ultravioleta del espectro solar (285-315 nm), aspecto en el que la formulación juega un papel fundamental (Jackson *et al.*, 2000). Las cepas seleccionadas para la producción de micoinsecticidas deben tener condiciones térmicas adaptadas a los hospedantes y hábitats donde van a ser empleadas (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2000). Para la aplicación en terreno se ha comprobado que el mejor método es hacer una suspensión de esporas en aceites vegetales o minerales, debido a que éstos contribuyen a proteger al hongo de los rayos ultravioleta, principal causa de pérdida de viabilidad, y además mejorar la adherencia, sobre todo en aplicaciones al follaje, para el control de plagas aéreas. La principal dificultad con los aceites, es que se requiere necesariamente de una bomba de ultra bajo volumen, para utilizar una baja cantidad de aceite por superficie. En la aplicación de estos hongos, en general se recomienda una dosis mínima de  $10^{12}$  esporas por hectárea, para las plagas que se encuentran expuestas a la acción directa de hongos, y dosis cercanas a  $10^{13}$  para plagas subterráneas (Gerding *et al.*, 2003). El aceite por si mismo puede contribuir a aumentar la eficacia del hongo, lo

cual según Prior *et al.* (1988). Puede deberse a que el aceite mejora la penetración gracias a sus propiedades cutinofílicas, que permiten que un mayor número de conidios alcancen las membranas intersegmentales susceptibles, así como también mejora la adhesión de los conidios a la cutícula del insecto.

### **Efecto del suelo**

Se sabe que el suelo tiene agentes fungistáticos, los cuales obstaculizan el desarrollo de las conidias, reduciendo el nivel de germinación de las mismas. En algunos casos este efecto está asociado con otros microorganismos del suelo, por ejemplo, los metabolitos que genera *Penicillium urticae* inhiben la germinación y desarrollo micelial de *B. bassiana* (Rosas, 1994).

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### METODOLOGIA

Los bioensayos con *Tenebrio molitor* y *Diaphorina citri* se llevaron a cabo en las "cámaras bioclimáticas" de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, departamento de Parasitología; estas instalaciones están localizadas a 25° 23' N, 101° 00' W, con una altitud de 1743 msnm. en Buenavista Saltillo, Coahuila durante el año 2010. La aplicación llevada a campo, se realizó en un cultivo de limón mexicano, junto a las instalaciones del INIFAP, campus Ixtacuaco, Veracruz México, localizado a 20°02' 30.79" N y 97°05' 55.41 "W; durante el año 2011.

En la producción a gran escala para conidias del hongo *B. bassiana*, conidias del hongo fueron inoculadas en granos de arroz como sustrato; la cepa que se utilizó fue *B. bassiana* B6C obtenida de un orthoptero parasitado por el mismo hongo la cual fue cultivada en cajas petri en medios sólidos con Agar PDA ó agar dextrosa Sabouraud. Para la producción en sustrato sólido con arroz, 100 g fueron colocados en bolsas individuales de polietileno y se le agregó agua (aproximadamente 250 mL.); se cerraron las bolsas con doble doblez y sujetada con diurex o grapas, para poder esterilizarlo en autoclave a 121 °C por 25 minutos. Luego de enfriarse a temperatura ambiente, las bolsas se llevaron a la campana del laboratorio para inocular el arroz en las bolsas con el hongo *B. bassiana*; para evitar la mínima contaminación por otros organismos, se preparó una solución con antibiótico (1 mg/ mL) en un matraz de un litro, a la que se le agregó conidias de *B. bassiana* hasta formar una solución concentrada de conidias. De la suspensión con las conidias y con el antibiótico, se tomaron 10 mL con jeringas esterilizadas y se inyectaron a las bolsas con el arroz para que en este medio se desarrollara el hongo y obtener una alta producción de conidias. Las bolsas fueron incubadas durante 15 días a una temperatura de 24 °C (Sahayaraj y 2008 Namasivayam); las conidias fueron cosechados de granos colonizados por el hongo usando bolsas de malla antipulgón (20 x 30 cm). El polvo conidial fue colocado en refrigeración (4°C hasta su uso en

campo). Las concentraciones de conidias por gramo del material cosechado fueron determinadas con un hematocitómetro (o cámara de Neubauer). Este método artesanal fue usado por Aquino *et al.* (1977), Mendonça (1992), Feng *et al.* (1994), Pu *et al.* (2005).

## 1) BIOENSAYOS CON *Tenebrio molitor* EN LABORATORIO

Las cepa de *B. bassiana* (B6C) que se empleó fue aislada de un saltamontes infectado por este hongo y colectado del Bajío-UAAAN. Se cultivó en medios sólidos (Agar PDA ó agar dextrosa Sabouraud) en cajas petri; para luego elaborar las diferentes formulaciones y aplicarlas contra inmaduros de *T. molitor*; utilizando un mismo tamaño de las larvas para los tratamientos.

Se emplearon las formulaciones siguientes: talco, tierra de diatomea, aceite vegetal, Tween y sabia de nopal, usando como vehículo adicional el agua. Se tomó 1 g de talco (sin efecto fungicida) con conidias de *B. bassiana* en 20 mL de agua (excepto el aceite vegetal) y se licuó para dispersar las conidias de *B. bassiana* ( $3.0 \times 10^7$ , conidias/mL). La formulación con la tierra de diatomeas se efectuó de la misma manera que el talco ( $1.4 \times 10^8$  conidias/mL); para el aceite vegetal, se tomó 1 mL de aceite y se le agregó las conidias ( $7.2 \times 10^6$  conidias/mL) formando una emulsión sin agua; para el Tween 20 (suspensión acuosa) se hizo una solución al 0.025%, se le agregaron las conidias ( $3.0 \times 10^6$  conidias/mL); y con la savia de nopal, se obtuvo rebanando nopales, para que estos liberaran su sabia colectada en un recipiente y se formuló una solución al 1% del néctar obtenido de los nopales, para luego agregarle conidias de *B. bassiana* ( $2.4 \times 10^6$  conidias/mL). Todo se licuó por separado para lograr la suspensión de esporas en cada uno de los diferentes vehículos (excepto el vehículo de aceite que fue de forma manual).

Para el diseño del bioensayo se colocaron 4 larvas de *T. molitor* en cada caja Petri con 4 repeticiones por tratamiento, se les colocó una bola de algodón con humedad para favorecer el desarrollo del hongo. La inoculación se efectuó con

ayuda de la punta de un pincel y se le colocó una micro gota en el dorso del inmaduro.

**Tabla 1. Formulaciones y concentraciones, contra *T. molitor*.**

<b>Hongo/cepa</b>	<b>Formulación</b>	<b>Concentración</b>
<i>B. bassiana</i> (B6C)	Aceite vegetal 1,2,3	7.2x10 <sup>6</sup> conidias/mL
	Talco (Max.o)	9.2x10 <sup>7</sup> conidias/mL
	Tierra de diatomeas	1.4x10 <sup>8</sup> conidias/mL
	Baba de nopal	2.4x10 <sup>6</sup> conidias/mL
	Tween	3.0x10 <sup>6</sup> conidias/mL

## **2) BIOENSAYO CON *D. citri* EN LABORATORIO**

### **Colecta de adultos de *D. citri* para bioensayo en laboratorio**

Se colectaron insectos adultos de *D. citri*, en parcelas de cítricos ubicados en General Terán, Nuevo León, y se trasladaron al Depto. de Parasitología de la UAAAN, para iniciar los respectivos bioensayos en una cámara bioclimática.

La cepa del hongo utilizada fue *B. bassiana* (B6C), se cultivó en medios de cultivos sólidos (Agar PDA ó agar dextrosa Sabouraud). Para luego aplicar conidias del hongo contra insectos de *D. citri*, en formulación aceite vegetal (emulsión) y suspensión Tween 20.

### **Condiciones del Bioensayo**

Se usaron recipientes de plástico de ½ litro con perforaciones en las tapas, en su interior una esponja con agua, y sobre la esponja, 1 ó 2 hojas de limón, con la finalidad de que las hojas de limón no se deshidrataran. Finalmente se colocaron 10 a 14 adultos de *D. citri* por cada recipiente (una repetición). El primer tratamiento que se realizó, fue una emulsión de conidias con el aceite vegetal en 3 mL, a esos 3 mL

de aceite vegetal se le fue agregando las conidias hasta llegar a una concentración  $1 \times 10^8$  conidias/mL de aceite, haciendo el conteo con ayuda de una cámara de Neubauer. El otro tratamiento fue una formulación en Tween 20 (suspensión acuosa); en un litro de agua se le agregó el 0.025% de Tween 20, lo que es lo mismo 0.25 ml/Lt de Tween. De esta solución se tomaron 10 ml para agregarle conidias, hasta llegar a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/mL. Comprobamos el número de conidias con una cámara Neubauer en el microscopio compuesto.

Por lo tanto resultan dos tratamientos o formulaciones: la emulsión de conidias en aceite vegetal ( $1 \times 10^8$  conidias/mL de aceite), y la convencional, conidias en Tween 20 al 0.025% ( $1 \times 10^8$  conidias/mL), con sus respectivos testigos; quedando 4 tratamientos en total y cada uno con cuatro repeticiones.



Ilustración 7. Recipiente acondicionado contenedor de *Diaphorinas* tratadas por el hongo.

Para ambas formulaciones, se hizo una aplicación a la cutícula con mucho cuidado sobre los tarsos del insecto y con ayuda de un cabello; previamente, tuvimos que anestesiarse a los insectos (*D. citri*) para poderlos manipular. Se logró al introducir  $\text{CO}_2$  por ocho segundos en un recipiente con un número considerable de *Diaphorinas* las que se pudieran inocular en un minuto, ya que es el tiempo en el que los insectos comienzan a activarse después de anestesiarse con el  $\text{CO}_2$ .

**Tabla 2. Formulaciones hechas contra *D. citri***

<b>Tratamiento/hongo</b>	<b>Tipo de formulación</b>	<b>Concentración</b>
<i>B. bassiana</i>	EMV	1x10 <sup>8</sup> esporas/mL
<i>B. bassiana</i>	T20	1x10 <sup>8</sup> esporas/mL

EMV =Emulsión en aceite vegetal; T20 = suspensión en tween al 0.025%

**3) APLICACIÓN EN CAMPO (INIFAP, CAMPUS IXTACUACO, VERACRUZ MÉXICO), DE *B. bassiana* EN DOS FORMULACIONES: EMULSIÓN (ACEITE MINERAL PURESpray AL 0.5%) Y EN TWEEN (0.025%).**

Las aplicaciones en campo se hicieron con apoyo de las instalaciones del INIFAP, campus Ixtacuaco, Veracruz localizado a 20°02' 30.79" N y 97°05' 55.41 "W, debido a que ahí se encuentra el psílido todo el año, y con la finalidad de encontrar las condiciones adecuadas para que el hongo tuviera efecto como insecticida sobre el insecto.

Las formulaciones fueron aplicadas en arboles de limón de una parcela (50 mts x 120 mts) ubicada al sur y a 200 metros de las instalaciones del INIFAP. A una altitud de 151 msnm y con un clima cálido-húmedo, temperatura media anual y precipitación de 23.7°C y 1840 mm, respectivamente. En términos de agroecología, la región está en el bosque de hoja perenne semi tropical.

Los árboles del huerto no fueron podados, ni había sido rociado con insecticidas o fungicidas durante al menos ocho meses. La temperatura promedio se extendió de 32°C (el 11 de abril de 2011) a 37°C (el 18 de abril de 2011). La humedad relativa media se extendió del 55% (el 11 de abril de 2011) al 70% (el 18 de abril). La primera aplicación se realizó el 14 de abril del 2011 por la tarde; y la segunda aplicación se realizó el 15 de abril del 2011 también en la tarde.

Se localizaron árboles de limón con brotes jóvenes que en efecto estaban infestados con ninfas de *D. citri*, para poderlos marcar (los árboles) al azar con listones de colores, y que representara con cada color a un diferente tratamiento. En algunos tratamientos se realizaron 2 aplicaciones con su respectiva formulación, lo cual para poder identificarlos se le colocó 2 listones por árbol.

Cada tratamiento incluyó 4 repeticiones; los árboles tenían 2-2.5 m alto, plantado a 3 mts. entre línea y línea. Quedando así, un diseño completamente aleatorio fue conducido con el arreglo 2x2x2 factorial (el número de aplicaciones, tipo de formulación, y la incubación respectivamente). Cada aplicación (preparación fungosa) consistió en aproximadamente un litro/árbol. Para los tratamientos que se diferencian en el número de aplicaciones (1 y 2), de 8 árboles/tratamiento fueron tratados primero con 1L aproximadamente de la preparación fungosa, y de esos 8 árboles solo a 4 árboles de cada uno de los tratamientos anteriores fueron rociados dos veces (1L) y marcado dos veces por el mismo color también, con un intervalo de 24 horas para la segunda aplicación y por tanto cada repetición. La finalidad de una segunda aplicación debía tratar de infectar a ninfas que surgieron de huevos después de la primera aplicación. Los hongos fueron rociados usando una fumigadora tipo mochila de motor (STIHL SR-420) (poder de 2.6 kW, desplazamiento 56.5 cm<sup>3</sup>, Peso: 11.1 kilogramos,).

### **Colección de datos**

La colección de muestras se inició 72 horas después de la primera aplicación o 48 horas después de la segunda aplicación. Los brotes fueron colocados en bolsas de polietileno Ziploc de 16.5 x14.9 cm (Ziploc, S. C. Johnson, Racine, WS), teniendo en total 64 muestras para todos los tratamientos incluyendo a los testigos y por lo tanto 4 bolsas por tratamiento. Para el traslado de las muestras, la mitad de cada tratamiento, se colocaron junto con hielo en una hielera, para que una vez llegando al laboratorio, (Parasitología-UAAAN) incubar a esas mismas muestras a 4 °C, por un total de 48 hrs; esto fue para matar a las ninfas y al mismo tiempo hacer más lento el desarrollo del hongo en las ninfas y que estas pudieran disecarse, para luego



observar microscópicamente o desarrollar al hongo en cámara húmeda, lo que indica la colonización fungosa interna. Al paso de 5 días después de la primera aplicación, se colocaron las ninfas en cámaras húmedas, igualmente las que se incubaron a 4 °C., esto a una temperatura de 25 °C en un periodo de 3 días, que fue cuando se presentó la esporulación. También consideramos como ninfas infectadas aquellos que tenían un pigmento rosado en el hemocele (Poprawski *et al.* 2000; Amin *et al.* 2010).

**Tabla 3. Formulaciones llevadas a campo**

Hongo/tratamiento	Tipo de formulación	Concentración	Num. de aplicaciones	Incubación
<i>B. bassiana</i>	Em	1x10 <sup>8</sup>	2	
	Em	1x10 <sup>8</sup>	2	4 °C
	Em	1x10 <sup>8</sup>	1	
	Em	1x10 <sup>8</sup>	1	4 °C
	T20	1x10 <sup>8</sup>	2	
	T20	1x10 <sup>8</sup>	2	4 °C
	T20	1x10 <sup>8</sup>	1	
	T20	1x10 <sup>8</sup>	1	4 °C

Em = emulsión de conidias de *B. bassiana* en aceite mineral agrícola (purespray foliar 22 E), al 0.5% en agua, T20 = suspensión de conidias de *B. bassiana* en Tween 20 al 0.025%, en agua y 4 °C representa los tratamientos que fueron incubados a esa temperatura por 24 hrs, antes de pasar a las ninfas en cámaras húmedas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1) Bioensayo con *Tenebrio molitor*

Se hizo el análisis de varianza (ANVA), para ello se usó el programa estadístico UNL, los resultados nos indican que hubo diferencia ente tratamientos aunque el C.V fue alto. Los índices de mortalidad varían para algunos tratamientos, ya que solo se usaron 4 larvas por cada repetición y cuatro repeticiones por tratamiento.

Tabla 4 . ANVA obtenida de los resultados del bioensayo con *Tenebrio molitor*.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Trat	9	50140.63	5571.18	13.54	<b>0.00</b>
Error	30	12343.75	411.45		
Total	39	62484.37			

C.V. = 47.04%

**Comparación de medias en la mortalidad del *T. molitor* por *B. bassiana* en diferente formulación.**

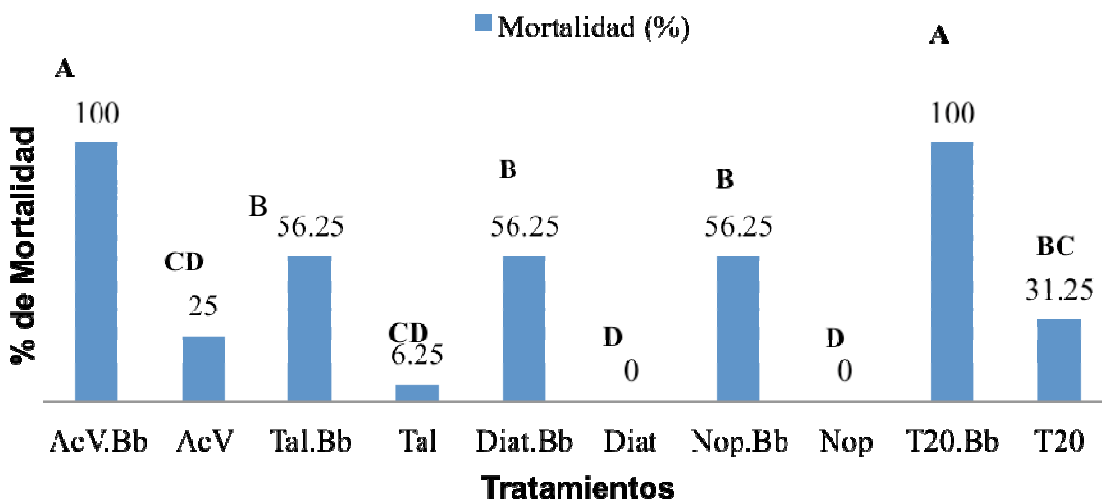


Ilustración 8. Comparación de medias de bioensayo *T. molitor*.

AcV.Bb = Emulsión de conidias de *B. bassiana* en aceite vegetal 1,2,3; AcV = aceite vegetal (testigo); Tal.Bb = conidias de *B. bassiana* en talco; Tal = talco (testigo); Diat. Bb = Conidias de *B. bassiana* en tierra de diatomeas; Diat = Tierra de diatomeas (testigo); Nop.Bb = conidias de *B. bassiana* en baba de nopal; Nop = baba de nopal (testigo); T20.Bb = conidias de *B. bassiana* en tween al 0.025% y T20 = testigo tween. Las medias con las mismas letras mayúsculas no son diferentes según la prueba de Tukey. Nivel de significancia = 0.05

Basándonos con la comparación de medias, el tratamiento 1 fue el mejor: Emulsión de conidias de *B. bassiana* en aceite vegetal ( AcV.Bb); lo mismo que el tratamiento 9: suspensión de conidias en Tween 20 al 0.025% (T20.Bb). Esto es con respecto a los tratamientos restantes que tuvieron el 56% de mortalidad a las 210 hrs después de la inoculación de las larvas con el hongo. Sin embargo el aceite vegetal y Tween como testigos por sí mismos, provocan mortalidad en las larvas con un índice menor que con los tratamientos formulas con las conidias de hongo *B. bassiana*,

## 2) Bioensayo con *D. citri* en laboratorio

La realización de estos bioensayos fue en la cámara bioclimática, a una temperatura de 25 °C, temperatura favorable para el psílido. Para este caso el análisis de varianza (ANVA) está dentro del margen de aceptación, e indica que hubo diferencia significativa entre las formulaciones hechas con el hongo, con respecto a los testigos. La formulación hecha con aceite vegetal mas conidias de *B. bassiana* (AcV.Bb), en donde el tipo de formulación viene siendo una emulsión, presentó el mayor porcentaje de mortalidad (92.5%); sin embargo, la formulación convencional (suspensión de conidias en Tween al 0.025% T20.Bb) causó un 75% de mortalidad.

**Tabla 5. Análisis de varianza (ANVA), obtenida del bioensayo con *D. citri* en el laboratorio.**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>
Trat	3	18618.75	6206.25	25.9	0.000
Error	12	2875	239.58		
Total	15	21493.75			

C.V. = 30.57% y Nivel de significancia = 0.05

### Comparación de medias, bioensayo con *D. citri* en Laboratorio

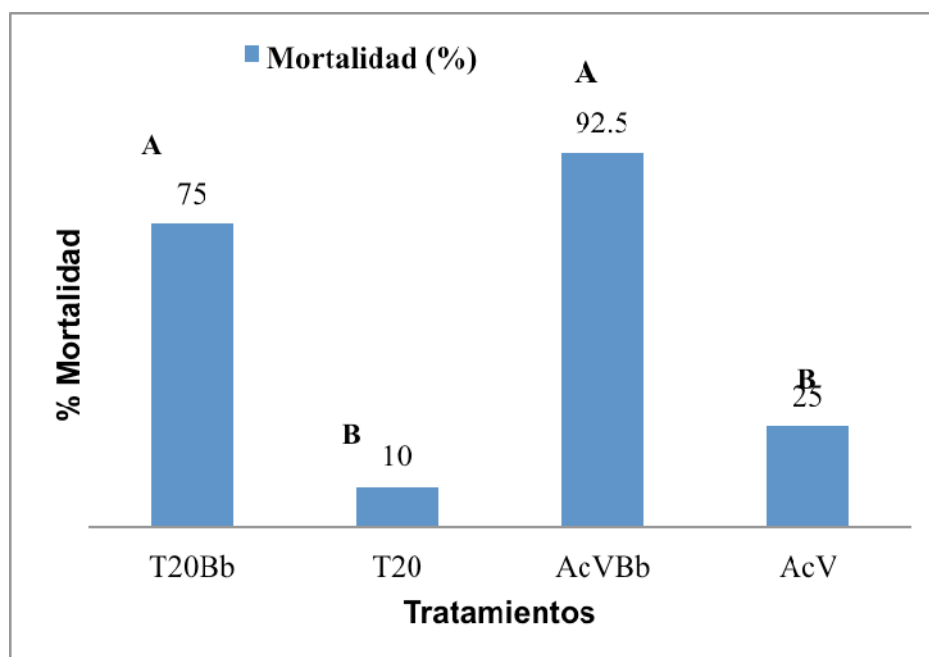


Ilustración 9. Bioensayo con *D. citri* en laboratorio.

T20Bb = suspensión de conidias de *B. bassiana* en Tween 20; AcVBb = emulsión de conidias de *B. bassiana* en aceite vegetal; T20 = testigo Tween 20; AcV = testigo aceite vegetal. Las medias con las mismas letras mayúsculas no son diferentes según la prueba de Tukey.

Cabe mencionar, que la formulación en aceite vegetal, su efectividad como insecticida contra *D. citri*, es más rápido que la formulación preparada con Tween 20. El efecto insecticida en la emulsión de conidias en aceite vegetal, se observó entre los 5 y 6 días; mientras que en la suspensión de conidias en Tween se logró entre 8 y 10 días; Nguyen *et al*, (2010), obtuvo un 70.3% de mortalidad a los 10 días con la misma especie de hongo contra el pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricida*).

### 3) Aplicación de formulaciones de conidias de *B. bassiana* en campo (Veracruz)

Las condiciones en campo no fueron muy favorables el día de la aplicación, debido a que las temperaturas fueron elevadas (32 – 37 °C) y la humedad relativa baja (55 – 75%); a pesar de ello si hubo infección por parte del entomopatógeno *B. bassiana*.

**Tabla 6. ANVA de los resultados obtenidos y realizados en campo**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Trat	11	55722.06	5065.64	16.74	0.00
Error	36	10892.75	302.57		
Total	47	66614.81			

C.V. = 51.26% y nivel de significancia = 0.05

El ANVA fue significativa; basándonos con la comparación de medias, si hubo diferencia entre tratamientos. El tratamiento 1 (2EM) presentó el mayor porcentaje de infección, debido al tipo de formulación (aceite mineral agrícola). Las formulaciones realizadas con aceite mineral agrícola presentaron mayor índice de mortalidad, que en las formulaciones hechas con Tween 20. Y tal como se esperaba, existió mayor porcentaje de infección cuando se hizo una segunda aplicación a las 24 hrs. después de la primera. Por lo contrario, en la incubación de las muestras colectadas en campo y que fueron sometidas por 36 hrs. a 4 °C, esas muestras resultaron con un menor porcentaje de infección con respecto a las muestras que no se sometieron.

### Comparación de medias de la aplicación en campo

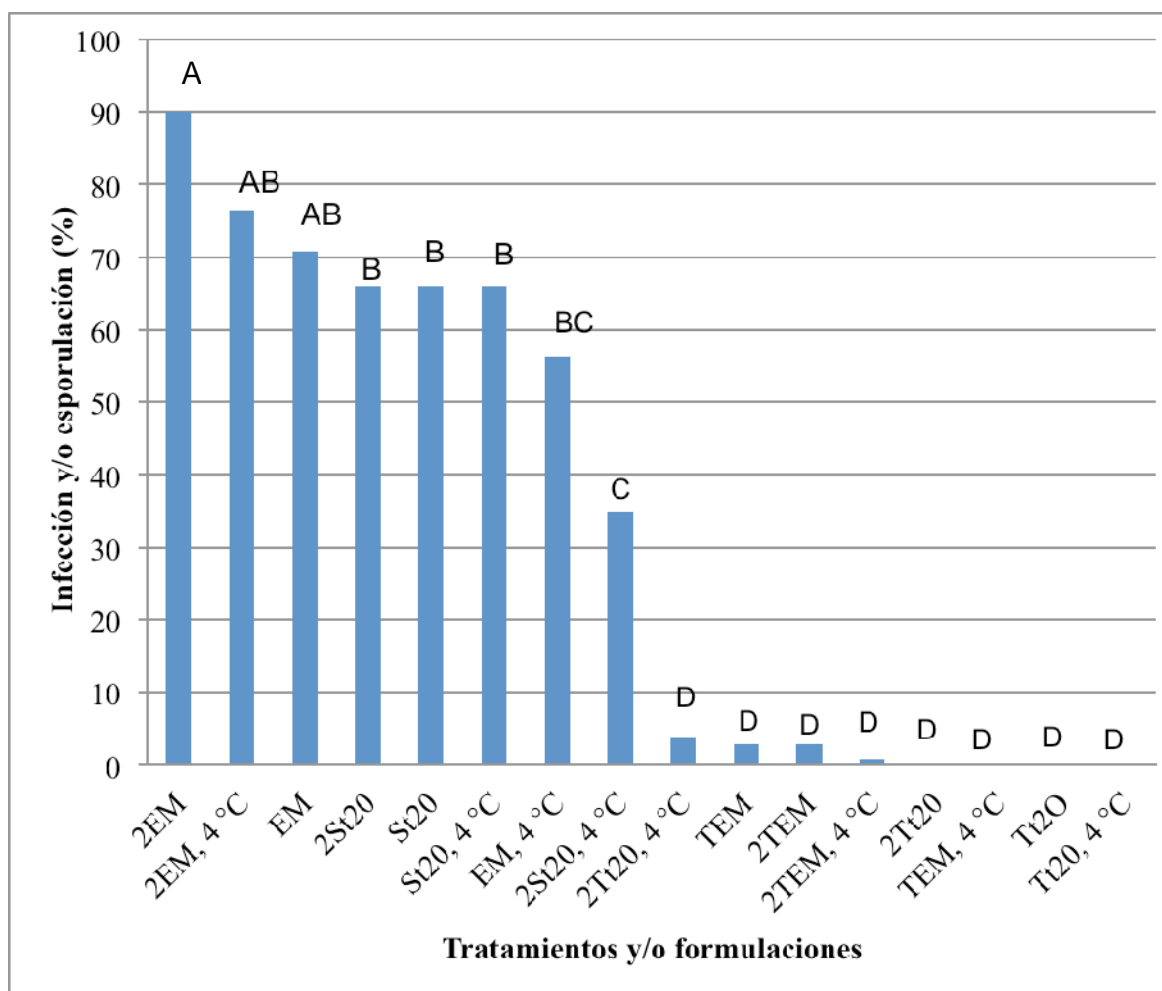


Ilustración 10. Porcentaje de esporulación del hongo *B. bassiana* con cada una de las formulaciones.

2EM = emulsión de conidias en aceite mineral agrícola Pure spray foliar 22E en agua (dos aplicaciones); 2EM, 4 °C = emulsión de conidias en aceite mineral agrícola Pure spray foliar 22 E, incubado a 4 °C (dos aplicaciones); 2St20 = suspensión de esporas en Tween 20 al 0.025% en agua (dos aplicaciones); St20, 4 °C = suspensión de esporas en Tween 20 al 0.025% en agua incubado a 4 °C (1 aplicación); 2Tt20, 4 °C = Testigo, Tween 20 al 0.025% en agua incubado a 4 °C (dos aplicaciones); TEM = testigo, emulsión de aceite mineral agrícola Pure spray foliar 22 E en agua (una aplicación). Las medias con las mismas letras mayúsculas no son diferentes según la prueba de Tukey.

## CONCLUSIONES

El hongo entomopatógeno *B. bassiana* (cepa B6C), en su producción a grande escala, creció y se desarrolló de manera intensiva en cultivo sólidos de arroz, además de que es un medio económico para la producción de conidias y por consiguiente, puede ser accesible para los productores si lo comparamos con medios sólidos de Agar PDA ó agar dextrosa Sabouraud.

En los bioensayos hechos en la cámara bioclimática con *T. molitor* y *D. citri*, basándonos en la comparación de medias, se observó que la formulación de conidias de *B. bassiana* en Tween (T20.Bb) y aceite (EM.Bb), produjeron el mayor porcentaje de mortalidad; casi un 50% más que las demás formulaciones (Nop.Bb, Diat.Bb y Tal.Bb) en el experimento con *T. molitor*.

El tiempo de mortalidad con las formulaciones en aceite (emulsión de conidias en aceite) se presentó a partir de tres días después de la inoculación, en relación a la suspensión de conidias en Tween, en donde empieza la mortalidad entre 5 y 6 días después de la inoculación.

En la realización en campo de este experimento, se probó que el aceite mineral agrícola (Pure spray foliar 22E al 0.5%) formulado con las esporas del hongo presentó mejores resultados comparado con la formulación en Tween, cuando se hace una segunda aplicación a las 24 hrs después de la primera. Eso indica que el aceite mineral agrícola posiblemente protege las conidias contra desecación y los rayos UV durante el día.



## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, S., Ahmad, N., Rasool K. R. 2004. Studies on Population Dynamics and Chemical Control of Citrus Psylla, *Diaphorina citri*. Int. J. Agri. Biol. 6(6): 970-73
- Alfaro, A. M. A. 1995. Efecto de aplicaciones de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., sobre las plagas de Maíz: Gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Smith) y Gusano Elotero *Helicoverpa zea* (Bobbie). Tesis de Licenciatura. UAAAN, Saltillo, Coahu., México. PP. 9-24.
- Alemán J. Baños H y Ravelo J. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad Huanglongbing: una combinación destructiva para la producción cítrica. Rev. Protección Veg. 22 (3): 154-165.
- 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.
- Amin GA, Youssef NA, Bazaid S, Saleh WD. 2010. Assessment of insecticidal activity of red pigment produced by the fungus *Beauveria bassiana*. World J. Microbiol. Biotechnol. 26(12): 2263-2268
- Aquino MLN, Vital AF, Cavalcanti VLB, Nascimento MG (1977) Cultura de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em sacos de polipropileno, Boletim Tecnico CODECAP. 5: 7-11.
- Aubert B., J.M. Bove & J. Ettiene. 1980. La lutte contre lamadie du greening des agrumes á l'ile de la Réunion. Resultats et perspectives. Fruits 35: 605-624.
- Aubert, B. 1987. *Trioza erytreae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control stragegies. Fruits 42:149-162.
- Azevedo, J.L y Melo, I.S. (1998) Controle microbiano de insectos - pragas e seu melhoramento genético. Controle Biológico 1: 69-93.
- Bassanezi RB, (2010). Epidemiology of Huanglongbing and its implications on disease management. 2º Taller internacional sobre el Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos. Mérida, Yucatán, México.

- Batista Filho, A.; Alves, S.B.; Alves, L.F.A.; Pereira, R.M. y Augusto, N.T, (1998) Formulção de entomopatógenos. In Alves, S.B. Ed. Controle Microbiano de Insetos. São Paulo, Brasil, FEALQ, cap. 3.
- Beattie, A., P. Holford, D.J. Mabblerley, A.M. Haigh and P. Broadbent. 2008. On the origins of *Citrus*, Huanglongbing, *Diaphorina citri* and *Trioza erytrea*, pp.25-57. In: Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing. Abstract 11.8. USDA, University of Florida. Orlando, Florida.
- Belasque, J. Jr., Yamamoto, P. T., Pedreira de M. M., Bassanezi, R. B. Ayres, J. A., y Bové, J. M. 2010. Controle do *huanglongbing* no estado de São Paulo, Citrus research and Technology. Cordeirópolis, Sao Paulo, Brasil. V. 31. N. 1 p. 54-64.
- Bellis, G.; Hollis, D. y Jacobson, Sarah (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.
- Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, Century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88 (1), 7-37.
- Bové JM, Teixeira DC, Wulff NA, Eveillard S, Saillard C, Bassanezi RB, Lopes SA. Yamamoto PT & Ayres AJ (2008) Several Liberibacter and Phytoplasma species are individually associated with HLB. Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing, Orlando, p.152-155.
- 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: 30-53.
- CABI (CAB International) 2002 - For information on the Global Forest Compendium, visit the website: <http://tree.cabweb.org/Compendium/compenfrm.asp>
- CABI/EPPO. 2001. *Diaphorina citri*. Distribution Maps of Plant Pests, Map No. 334. Wallingford, UK: CAB International.
- Cáceres, S. (2002). El Psílido asiático *Diaphorina citri*, plaga potencial de los citrus: situación en Corrientes. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. <http://www.inta.gov.ar/bellavista/info/documentos/citricos/ps%EDlido.htm>

- Carballo, M. (1998) Formulación de hongos entomopatógenos. Rev. Manejo integrado de Plagas 47: 1-4
- Casamayor, A. 1998. Control Microbiológico de Plagas. Instituto Albert Einstein. Venezuela. [En línea]. Citado en Abril de 2010. [Http://www.lacapitalnet.com.or/agustinc/feria.htm](http://www.lacapitalnet.com.or/agustinc/feria.htm).
- 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.
- Cermeli, M., P. Morales, y F. Godoy. 2000. Presencia del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en Venezuela. Bol. Entomol. Venez. 15(2):235-243.
- Charnley, A.K. 1997. Entomopathogenic Fungi and their role in pest control, pp. 185-201. In Wicklow/Soderström (eds.), The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships.
- Chavan, V. M., y A. S. Summanwar. 1993. Population dynamics and aspects of the biology of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuw., in Maharashtra, pp. 286-290 .
- Chien, C.C., Chiu, S.C., Ku S.C. 1989. Biological control of *Diaphorina citri* in Taiwan. Fruits 44(7-8): 404-407.
- Chiou-Nan Chen. 1998. Ecology of the Insect Vectors of Citrus Systemic Diseases and Their Control in Taiwan. FFTC Publication Database.
- Chul-Kang, S., S. Park, D. Gyu-Lee, 1999. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology 73: 276-281.
- Cobelo, L. (2005). Un citrus sin intrusos. <http://www.clarin.com/suplementos/rural/2005/09/24/rA00411.htm> (Mayo, 2010)
- Coelho, M.V. y Marques, A. (2002): "Citrus greening" Uma bacteriose quarentenária que representa ameaça potencial à citricultura brasileira. Comunicado Técnico 58. Ministerio de Agricultura, Pecuária e Abastecimiento. 4 pp.

- 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. and S.P. Singh, 1994. Bioefficacy of some insecticides against citrus psylla, *Diaphorina citri* kuwayama (Psyllidae: Hemiptera). Crop Res. Hisar, India, 8: 137-40
- Díaz, Z. U. A. 2009. Estudio de evaluación de efectividad biológica de Actara®, para controlar diaforina (*Diaphorina citri*) en limón Persa (*Citrus latifolia* Tan.) INIFAP-Campo Experimental Ixtacuaco. Tlapacoyan, Ver. p 73.
- Díaz, Z. U. A. 2010. Estudio de evaluación de efectividad biológica de Engeo®, para controlar *Diaphorina citri* en limón Persa (*Citrus latifolia* Tan.). INIFAP-Campo Experimental Ixtacuaco. Tlapacoyan, Ver. p 33.
- Driesche, V y Bellows, T. 1996. Biological Control. Chapman y Hall. New York, United States of America. 539 páginas.
- Duperchy, E. 2003. Identification of up-regulated genes of the hyphomycete *Beauveria bassiana*, during the infection of *Leptinoptarsa dicemlineata*. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. 111 p
- EPPO. 2005. PQR database (version 4.4). Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization. <http://www.eppo.org/QUARANTINE>
- Étienne, J., S. Quilici, D. Marival and A. Franck. 2001. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). Fruits. 56: 307-315.

- FAO. (2005): Principales productores de alimentos y productos agrícolas. (En línea). Disponible en <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html;jsessionid=94FD1EA6512C46E206369CA85A0F571E?item=512&lang=es&year=2005>. (Consulta: 3-9-07).
- Feng MG, Poprawski TJ, Khachatourians GG (1994) Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Sci.Technol.* 4 (1): 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.
- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology* 23: 409-442.
- Ferron, P., J. Fargues and G. Riba. 1991. Fungi as Microbial Insecticides. In: Arora D.K. Ajillos and L.K.G. Mukerji (eds.), *Handbook of Applied Mycology. Humans, Animals and Insects.* Marcel and Dekker, Inc. New York. Volume 2: 665- 705.
- Floyd, J. M., and C. Krass. 2006 *New Pest Response Guidelines: Citrus Greening Disease.* USDA-APHIS-PPQ- Emergency and Domestic Programs, Riverdale, Maryland. [www.aphis.usda.gov/import\\_export/plants/ppq\\_manuals.shtml](http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/ppq_manuals.shtml).
- García Darderes, C.S. 2009. Distribución geográfica de *Diaphorina citri* kuwayama. Ministerio de la Producción. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Buenos Aires, Argentina.
- Gerding M.G., France A. I., Gerding M. P., Rodríguez M. S. 2003. Formulación de biopesticidas con hongos entomopatógenos. *INIA Tierra Adentro* 48: 24-25.
- Gillespie, A.T. and N. Claydon. 1989. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pest. Sci.* 27: 203-215.
- González, C. Borges, M., Gómez, M., Fernández, M., Hernández, D., Tapia, R. J., Cabrera, I. R., Beltrán, A. 2003. Manejo de *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae) en agroecosistemas cítricos de Cuba. *Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical.* La Habana, Cuba. p 14.

- González, C., D. Hernández, J. Rodríguez. 2001. Influencia de los enemigos naturales en el comportamiento de *Diaphorina citri* Kuw. (Homoptera, Psyllidae) en los cítricos de Cuba. IV Seminario Cientif. Internac. de Sanidad Vegetal. Varadero. Pag. 273 Hoy, Maryorie. 1998. A new pest of Florida. *Citrus. Citrus & Vegetable Magazine* september: 8-9.
- González, C. J. C., Castellanos, S. I. E., Fucikovsky, Z. J., López, H. M., Sánchez, R. G y Elorza, M. P. 2008. Dinámica de población y tasa de infección de *Diaphorina citri* al hongo *Hirsutella citriformis* en *Citrus sinensis* en Tuxpan, Veracruz, México. 1p.
- Grafton-Cardwell, Elizabeth.; Godfrey, K.; Rogers, M.; Childers, C. y Stansly, P. (2006): Asian Citrus Psyllid. ANR Publications 8205. (En línea). Disponible en <http://www.anrcatalog.ucdavis.edu>. (Consulta: 20-9-2007)of Florida citrus. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, University of Florida.
- Gravena, S., M. J. G. Beretta, P. E. B. Paiva, R. Gallao, and P. T. Yamamoto. 1996. Seasonal abundance and natural enemies of *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae) in citrus orchards of Sao Paulo State, Brazil, p. 414 In. J. V. da Graca, P. Moreno, and R. K. Yoomi (eds.), Proc. 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologist (IOCV). University of California, Riverside.
- 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.
- Hall, D. G., M. G. Hentz, and M. A. Ciomperlik. 2007. A comparison of traps and stem tap sampling for monitoring adult Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) in citrus. *Fla Entomol.*90: 327-334.
- Hall, D. G. 2008. Biological control of *Diaphorina citri*. I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (Candidatus Liberibacter spp) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*) Hermosillo, Sonora. México. p 7.
- 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.

- Jackson, T., S. B. Alves, and R. M. Pereira. (2000). Success in biological control of soil-dwelling insects by pathogens and nematodes. In: Gurr, G. M., and S. D. Wratten. (eds) *Biological Control: Measures of Success*. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA, pp 271- 296.
- Jefferies, B.L.L., I.J. Xavier, R.E. Matai and G.G. Khachatourians. 1999. Relationships between fungalspore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Verticillium*. *Can. J. Microbiol.*45: 936-948.
- Kershaw, M.J. and N.J. Talbot. 1998. Hydrophobins and Repellents: Proteins with Fundamental Roles in Fungal Morphogenesis. *Fungal Genetics and Biology* 23: 18-33.
- Kershaw, M.J., E.R. Moorhouse, R. Bateman, S.E. Reynolds and A.K. Charnley. 1999. The role of Dextruxins in the Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for Three Species of Insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 213-223.
- Liu, Y. H., y J. H. Tsai. 2000. Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Ann. Applied Biol.* 137:210-216.
- López-Arroyo, J.I., J. Loera-Gallardo, M.A. Reyes-Rosas, y M.A. Rocha-Peña. 2003a. Manejo integrado de plagas de los cítricos mediante enemigos naturales en México. p. 12-26. *In: 1er Simposio Internacional de Citricultura de Oaxaca*. Septiembre de 2003. Puerto Escondido, Oaxaca. México.
- López L.V.; Hans Börje J. (2001). Biodiversidad del suelo: control biológico de nemátodos fitopatógenos por hongos nematófagos. *Cuaderno de Biodiversidad* 6: 12 – 15.
- Lost, A. T. 2009. Estrategias de control del Huanglongbing, 2009. PROCIGO-IMDECIT. p 3.
- Madelin, M. F. 1963. Diseases caused by hyphomycetous fungi. In: Steinhaus, E (Ed.). *Insects pathology and advance treatise*. 'V01.2. Academic Press. New York, USA. pp. 223-264.

- Méndez, L. Y. 1990. Control microbiano de la broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae) con el hongo *Beauveria bassiana* (Bals. J Vuill. (Deuteromycetes) en el Soconusco, Chiapas. Tesis de Maestna en Ciencias. Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Posgraduados. Montecil los, México.
- Meyer J.M., M.A. Hoy, and D.G. Boucias. 2007. Morphological and molecular characterization of a *Hirsutella* species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. J. Invertebr. Pathol. 95 (2):101-9.
- Michaud, J. P. 2001. Numerical response of *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae) to infestations of Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) in Florida. Florida Entomol. 84: 608-612. Michaud, J. P. 2002. Biological control of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Florida: a preliminary report. Entomol. News. 113 (3): 2169-223.
- Michaud, J. P. 2002. Biological control of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Florida: a preliminary report. Entomol. News. 113 (3): 2169-223.
- Michaud, J. P., and L. E. Olsen. 2004. Suitability of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, as prey for ladybeetles. BioControl 49: 417-431.
- Michaud, J.P. 2004. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. Biological Control 29 (2): 260-269.
- Monzon, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. (63): 95-103.
- Nava, D., M. Torres, M. Rodrigues, J. Bento and J. Parra. 2007. Biology of *Diaphorina citri* (Hem. Psyllidae) on different hosts and different temperatures. J. App. Entomol. 131(9-10):709-715.
- Nguyen Thi Loc, Vo Thi Bich Chi, Nguyen Thi Nhan, Tran Thi Be Hong, Nguyen Thi Phuong Chi and Nguyen Thi Nghia. 2010. EXPLOITATION OF *Beauveria bassiana* AND *Metarhizium anisopliae* AS POTENTIAL BIOCONTROL AGENTS IN INTEGRATED PEST MANAGEMENT (IPM) ON CITRUS. Omonrice 17: 152-163 (2010). <http://clrri.org/lib/omonrice/17-19.pdf>



- OEPP/EPPO. 1988. Data sheets on quarantine organisms No. 151, Citrus greening bacterium and its vectors *Diaphorina citri* and *Trioza erytreae*. EPP/EPPO Bulletin 18:497-507.
- Orozco, S. S. 1995. Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México, Universidad Autónoma Chapingo, México. 150 p
- Peña, J.; Mannion, C.M.; Ulmer, B.J. y Halbert S.E. (2006): Jackfruit, *Artocarpus heterophyllus*, is not a host of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Florida. *Fla. Entomol.* 89(3): 412- 413.
- Pluke, R. W. H., A. Escribano, J. P. Michaud, and P. A. Stansly. 2005. Potential impact of ladybeetles on *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Puerto Rico. *Florida Entomol.* 88: 123-128.
- Polek, M., G. Vidalakis, and K. Godfrey. 2007. Citrus bacterial canker disease and Huanglongbing (Citrus greening). ANR. Publ. 8218. University of California. Davis.
- Poprawski TJ, Greenberg SM and Ciomperlik MA. 2000. Effect of Host Plant on *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* Induced Mortality of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Environ. Entomol.* 29(5): 1048-1053
- Prior, C; Jollands, P; Patourel, GL. 1988. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* ( D e u t e r o m y c o t i n a : Hyphomycetes) to cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* ( C o l e o p t e r a : C u r c u l i o n i d a e ) . *Journal of Invertebrate Pathology* 52:66-72.
- Pu XY, Feng MG, Shi CH (2005) Impact of three application methods on the field efficacy of a *Beauveria bassiana*-based mycoinsecticide against the false-eye leafhopper, *Empoasca vitis* (Homoptera: Cicadellidae) in the tea canopy. *Crop Prot.* 24:167–175
- Quesada-Moraga, E. Y Santiago-Álvarez, C. 2000. Rearing and breeding of the Mediterranean locust *Dociostaurus maroccanus* under laboratory conditions. *Journal of Applied Entomology.* 125 (3): 121-12.

- Rae DJ, Liang WG, Watson DM, Beattie GA, Huang MD. 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.
- Ramoska, W. A. 1984. The influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the chinch bug, *Blissus leucopterus*. *Jour. Invert. Pathol.* 43(3): 389-394.
- Rehner, S. 2005. A *Beauveria* Phylogeny Inferred From Nuclear ITS and EF1-a Sequences: Evidence for Cryptic Diversification and Links to cordyceps teleomorphs. *Mycologia*, 97(1): 84-98.
- Roberts, D.W. 1989. World picture of biological control of insects by fungi, pp. 89-100. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.* 84, Supl. III.
- Robles- González M. M., J.J. Velázquez-Monreal, M. Orozco Santos. 2010. El psílido asiático *Diaphorina citri* Kuwayama. INIFAP- Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Col. p 20.
- Rodríguez, A. & E. Del Pozo. 2003. Aislamiento de hongos entomopatógenos y evaluaron su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* (west). *Agrociencia*. 7(2): 71-78.
- Roistacher, C.N. 1991. Techniques for biological detection of specific citrus graft transmissible diseases, pages 35-45 (Greening). FAO, Rome37.
- Rosas, A. J. L., 1994. Hongos entomopatógenos contra las plagas insectiles. *Memorias. V Congreso de Control Biológico. Oaxaca, México.* PP. 85-99.
- 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
- Sahu, S.R. and S.K. Mandal, 1997. Population dynamics of citrus psylla, *Diaphorina citri* kuwayama (Psyllidae: Hemiptera). *J. Interacadem.*, 1: 329-32.
- Samson, R.; H. Evans & J.Latge. 1988. *Atlas of Entomopathogenic Fungi.* Springer-Verlag, Berlin. 300 pp.

- Sánchez, P. S., 1993. Biología y aplicación de hongo. Samson, R.; H. Evans & J. Latge. 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, Berlin. 300 pp.
- Sahayaraj K, Namasivayam SKR (2008) Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. African J. Biotechnol. 7 (12):1907-1910
- SPSS. 2003. Statistical package for the social sciences. Base 12.0 user's guide. 368 p. SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA.
- Shivankar, V.J., C.N. Rao, S. Shyam and S. Singh, 2000. Studies on citrus psylla, *Diaphorina citri* kuwayama: a review. Agric. Rev., 21: 199-204
- Steinhaus, E. A. 1960. The importance of environmental factors in the insect-microbe ecosystem. Bacteriol. Rev. 24: 365-373.
- St. Leger, R. J., M. Goettel, D.W. Roberts and R.C. Staples. 1991. Pre-penetration events during infection of the host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. J. Inverteb. Path. 58: 168-179.
- 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.
- Su, H. 2011. A Rapid, Less-Costly and Accurate Detection of Citrus Greening (HLB) Pathogen in the Aspac Region (Year 2). <http://www.agnet.org/library/ac/2008m/>: Fecha de consulta: 14-09-2011.
- Tanada, Y., Kaya, H. 1993. Insect Pathology. Academic Press. San Diego, California. (USA). 666 p.
- Trujillo-Arriaga J. 2010. Situación actual, regulación y manejo del HLB en México. 2º Taller internacional sobre el Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos. Mérida, Yucatán, México.
- 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.
- TAI, P.-J.; MCINTOSH, J.; PEARCE, P.; CAMDEN, B.; JORDAN, B. R. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. Food Research International. 35, 351356.

- VÉLEZ, A.; POSADA, F.; MARÍN, M.; GONZÁLEZ, G.; OSORIO, V.; BUSTILLO, P.  
Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Investigaciones del Café. Boletín Técnico, 1997, 17, 37 págs.
- Wang, L.Y., Hung, S.C., Hung T.H., Su, J. 1996. Population fluctuations of *Diaphorina citri* kuwayama and incidence of citrus liqubin in citrus orchards in chaiyi area. Pl. Protect. Bull., Taipei, 38: 355-65.
- 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.
- Wooler A, D. Padgham, and A. Arafat. 1974. Outbreaks and new records. Saudi Arabia. *Diaphorina citri* on citrus. Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO), Plant Protection Bulletin 22: 93-94.
- Yamamoto, P. T., e Miranda, M. P. 2009. Controle do psílídeo *Diaphorina citri*. Ciencia e Prática. Gupo Técnico de Assistencia e consultoria em citrus. Bebedouro, Sao Paulo, Brasil. 1:10-12.