

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Patogenicidad de *Isaria fumosorosea* (cepa IF8B19) Contra *Diaphorina citri*
(Hemiptera: Liviidae) y su Interacción con Dos Hongos Entomopatógenos

Por:

CELSO MORALES REYES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México.

Abril, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Patogenicidad de *Isaria fumosorosea* (cepa IF8B19) Contra *Diaphorina citri*
(Hemiptera: Liviidae) y su Interacción con Dos Hongos Entomopatógenos

Por:

CELSO MORALES REYES

TESIS

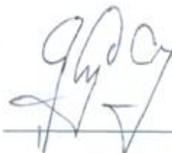
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

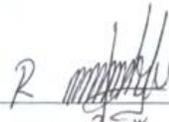
Aprobada



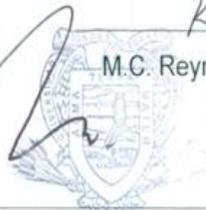
Dr. Sergio René Sánchez Peña
Asesor principal



Dr. José Isabel López Arroyo
Coasesor



M.C. Reyna Ivonne Torres Acosta
Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinador de la División de
Agronomía

Saltillo, Coahuila, México.

Abril, 2015

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Gracias por ser la institución que me dio todas las oportunidades para lograr superarme profesionalmente.

Al Dr. Sergio René Sánchez Peña. Gracias por sus enseñanzas, amistad, y sus consejos, así como por mostrarme las oportunidades que incrementaron mi preparación profesional.

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

A la M.C. Reyna Ivonne Torres Acosta. Por su ayuda en la preparación y revisión de éste trabajo.

Al Dr. Steven P. Arthurs. Por su apoyo en la realización de mi estancia profesional, sus enseñanzas y amistad.

DEDICATORIA

A mis padres:

Celso Morales Sánchez

y

Verónica Reyes Arcos

Por su excepcional apoyo, su fe, comprensión, paciencia y todas esas virtudes que siempre muestran, y por saber que siempre estarán conmigo en mi camino de vida.

A mis hermanos: Fernando Morales y Sergio Morales. Por su apoyo y motivación.

A mis abuelos: Martín Reyes, Carmen Arcos y Guadalupe Sánchez. Por su constante apoyo y afecto.

A mi familia: Gonzalo Reyes, Cristina Hernández, Alfredo Reyes, Cristian y Juan. Por su continuo apoyo y motivación.

A mis amigos: Roberto Duarte, Mariana G. López, Blanca Estela, José Alberto Benavides, Mariam Carranza, José Antonio Rodríguez, Fernando Sánchez, Fredy Herrera, José Madrigal, Fabian Quintero, Modesta Herrera, Karenji, Nastaran, Alejandro, Adrian, José, Luis Aristizábal y a los que me faltan. Por acompañarme en muchas etapas de mi vida, con los que compartí muchos buenos y malos momentos, que siempre me apoyaron y que por su amistad he aprendido mucho.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	V
ABSTRACT	VII
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Huanglongbing (HLB).....	4
Sintomatología.....	5
Diagnóstico.....	6
El Psílido Asiático de los Cítricos <i>Diaphorina citri</i>	7
Clasificación taxonómica	8
Biología y ciclo de vida.....	9
Morfología.....	10
Importancia de <i>Diaphorina citri</i>	12
Control del Psílido Asiático de los Cítricos (PAC).....	13
Control químico.....	14
Control biológico.....	14
Parasitoides.....	15
Depredadores.....	15
Hongos entomopatógenos.....	15
<i>Isaria fumosorosea</i> Wize.....	16
Clasificación taxonómica.....	17
Características de <i>Isaria fumosorosea</i>	17
Modo de acción.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19

Localización.	19
Obtención de las cepas.....	19
Producción de <i>Isaria fumosorosea</i> en medio de cultivo artificial.....	20
Técnica analíticas.	21
Conteo de esporas.....	21
Prueba de viabilidad.	21
Aplicación de <i>Isaria fumosorosea</i> en campo.....	22
Interacción de <i>I. fumosorosea</i> con dos hongos entomopatógenos <i>in vitro</i>	23
Análisis de los datos.	24
RESULTADOS.....	25
Aplicación de <i>Isaria fumosorosea</i> en campo.....	25
Interacción de <i>I. fumosorosea</i> con dos hongos entomopatógenos <i>in vitro</i>	29
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIÓN	34
LITERATURA CITADA.....	35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos aplicados contra <i>Diaphorina citri</i> en brotes de <i>Citrus sinensis</i> var. Valencia en General Terán, Nuevo León, México	23
Cuadro 2. Tratamientos (Confrontaciones) para la prueba de Interacción de <i>Isaria fumosorosea</i> con otros hongos entomopatógenos en laboratorio	24
Cuadro 3. Medias de la mortalidad corregida (\pm Error estándar, SEM) e intervalos de confianza al 95% de los tratamientos contra <i>Diaphorina citri</i>	26
Cuadro 4. Análisis de varianza de la aplicación de hongos entomopatógenos contra <i>Diaphorina citri</i> en brotes de <i>Citrus sinensis</i> var. Valencia.....	26
Cuadro 5. Medias de los porcentajes de psílicos micosados (\pm Error estándar, SEM) e intervalos de confianza al 95%.....	28
Cuadro 6. Análisis de varianza de la esporulación de los hongos entomopatógenos sobre <i>Diaphorina citri</i> , evaluado tres semanas post-aplicación	28
Cuadro 7. Medias de crecimiento radial diario (\pm Error estándar, SEM) para cada confrontación (tratamiento).....	30
Cuadro 8. Análisis de varianza del crecimiento radial diario de las confrontaciones de <i>Isaria fumosorosea</i> con otros hongos <i>in vitro</i>	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas de HLB en los árboles infectados. A: Hojas con moteado asimétrico, B: Hojas con aclaramiento de nervaduras, C: Hojas con nervaduras corchosas, D: Frutos deformes, E: Frutos con coloración irregular, F: Amarillamiento y muerte regresiva.	6
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Diaphorina citri</i>	10
Figura 3. Huevecillos de <i>Diaphorina citri</i>	11
Figura 4. Instares ninfales de <i>Diaphorina citri</i>	11
Figura 5. Características del adulto de <i>Diaphorina citri</i>	12
Figura 6. Daño directo de <i>Diaphorina citri</i> en brotes de cítricos, causando deformación de las hojas	13
Figura 7. <i>Isaria</i> ; A: Sinemas. B: Racimo de cadenas conidiales divergentes. C, D y E: Celulas de los conidióforos (fiálides) con la base hinchada y con prominentes cuellos llevando conidias.....	18
Figura 8. Diagrama de las confrontaciones <i>in vitro</i> . Explantes (rojo y azul) distanciados a 20 mm. La medida de crecimiento radial diario fue tomada del centro de cada disco micelial en dirección al otro	24
Figura 9. Promedio de mortalidad corregida (\pm Error estándar, SEM) de los tratamientos contra <i>Diaphorina citri</i> en campo, letras diferentes sobre las barras de error indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al no traslape de IC 95%.....	27
Figura 10. Promedio de Porcentajes de micosis (\pm Error estándar, SEM) sobre <i>Diaphorina citri</i> tres semanas post-aplicación, letras diferentes sobre las barras de error indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al no traslape de IC 95%.....	29
Figura 11. Medias de crecimiento radial diario (\pm Error estándar, SEM) para cada confrontación. Letras diferentes sobre las barras de error indican diferencia significativa de acuerdo a Games-Howell.....	31

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la patogenicidad del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* Wize (cepa IF8B19) contra el vector de la enfermedad Huanglongbing, el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), así como evaluar la interacción de *I. fumosorosea in vitro* en conjunto con otros dos hongos entomopatógenos; *Metarhizium brunneum* cepa 6M11 y *Beauveria bassiana* cepa B6C. La eficacia de *I. fumosorosea* se evaluó en campo a una concentración de 1.19×10^8 conidios viables.mL⁻¹ y otro tratamiento de una mezcla de los hongos antes mencionados a una concentración de 1.4×10^8 conidios viables.mL⁻¹, formulado con Bionex como surfactante a una concentración de 0.05% v/v. La confrontación *in vitro* se realizó para cada especie fúngica mediante explantes miceliales distanciados a 20 mm, comparando su media de crecimiento radial diario.

En el bioensayo en campo *I. fumosorosea* alcanzó una mortalidad corregida de 32% de los psílicos adultos, mientras que el tratamiento de la mezcla de hongos obtuvo una mortalidad de 44%, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos fúngicos de acuerdo a ANOVA (P<0.05) pero si comparados con el testigo Bionex. El porcentaje de insectos micosados 3 semanas post-aplicación fue registrado para cada tratamiento, *I. fumosorosea* obtuvo un promedio de 28% y la mezcla de hongos alcanzó un promedio de 22%, de acuerdo al porcentaje de esporulación no se encontró diferencia estadística entre ambos tratamientos. Para la mezcla de los hongos entomopatógenos solo se observó esporulación de los hongos *I. fumosorosea* y *B. bassiana*, no se encontró ningún insecto micosado por *M. brunneum*. La confrontación de los hongos *in vitro* mostró diferencias significativas en cuanto al promedio de crecimiento radial diario para cada especie fúngica, sin embargo no se observó presencia de ningún halo de inhibición. El testigo del hongo *I. fumosorosea* creció 1.24 mm.día⁻¹, mientras que en la confrontación con *M. brunneum* obtuvo un promedio de 1.46 mm.día⁻¹ y que en conjunto con *B. bassiana* alcanzó un crecimiento diario de 1.96 mm, creciendo

más rápidamente con éste último. Los resultados obtenidos sugieren que *I. fumosorosea* tiene potencial como herramienta en el manejo integrado del psílido asiático de los cítricos, así como potencial para ser introducido en formulaciones mixtas con otros hongos entomopatógenos, sin embargo se requiere más investigaciones para mejorar el desempeño de éste hongo en campo.

Palabras clave: *Diaphorina citri*, Control biológico, Hongos entomopatógenos, *Isaria fumosorosea*, Interacción *in vitro*.

ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate the efficacy of the pathogenic fungus *Isaria fumosorosea* Wize (strain IF8B19) against the Huanglongbing vector, the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, furthermore to assess the interaction of *I. fumosorosea* in vitro with two entomopathogenic fungi. The efficacy of *I. fumosorosea* was evaluated on field conditions with the concentration of 1.19×10^8 conidia viable.mL⁻¹ formulated with Bionex (0.05% v/v) as surfactant, also a mix of entomopathogenic fungi was tested containing *I. fumosorosea*, *Metarhizium brunneum* (6M11) and *Beauveria bassiana* (B6C) adjusted to 1.4×10^8 conidia viable.mL⁻¹. The confrontation in vitro was performed for each fungal species through plugs with mycelia separated by 20 mm from each other; the rate of radial daily growth was measured over 5 days in order to obtain an average.

On the field application *I. fumosorosea* reached a corrected mortality of 32%, whereas the mix of entomopathogenic fungi treatment obtained 44% of adult's mortality, there was no statistical difference among fungal treatments according to ANOVA ($P < 0.05$) although all of them were different compare with Bionex control. The percentage of insects with mycosis 3 weeks post-application was recorded for each treatment, *I. fumosorosea* obtained an average of 28%, whereas the mix of entomopathogenic fungi reached an average of 22%, no statistical significance was found among treatments. On the insects treated by the mix of entomopathogenic fungi, the sporulation was observed only for *I. fumosorosea* and *B. bassiana*, however no insects were found with sporulation of *M. brunneum*. The entomopathogenic fungi confrontation *in vitro* showed some statistical differences on the radial daily growth for each fungal species. Although no inhibition halo was observed. The *I. fumosorosea* fungus grew 1.24 mm.day^{-1} when it was cultivated alone, confronted with *M. brunneum* obtained an average of 1.24 mm.day^{-1} , whereas cultivated in conjunct with *B. bassiana* reached a radial daily growth of 1.96 mm, growing relatively faster with this fungus. The results obtained on this research suggests that *I. fumosorosea* has the potential as tool into an integrated

management program against the Asian citrus psyllid, furthermore it showed the potential that might obtain in mixture formulations with another entomopathogenic fungi. However further research is necessary to improve the efficacy of this fungus on field.

Keys words: *Diaphorina citri*, Biological control, Entomopathogenic fungi, *Isaria fumosorosea*, *in vitro* Interactions.

INTRODUCCIÓN

La citricultura es una de las actividades agrícolas más importantes dentro del campo mexicano, la cual ocupa una superficie de 566,083 hectáreas cultivadas siendo México el quinto productor a nivel mundial con 7,613,105 toneladas producidas (FAO, 2015).

Los principales estados productores son; Veracruz, San Luís Potosí, Tamaulipas, Puebla y Nuevo León, los cuales representan el 77% de la producción nacional. La producción cítrica nacional se estimó con un valor superior a los 13 mil millones de pesos en el 2013 (SIAP, 2015).

Los principales frutos que integran la producción cítrica en México lo comprenden la naranja (63%), el limón mexicano (27%), la lima persa (5%), mandarina y toronja (5%). De dichos productos la naranja, el limón mexicano y la lima persa ocupan el mayor porcentaje de los cítricos establecidos. La citricultura mexicana beneficia a más de 65,000 productores y genera ingresos netos de más de 3,500 millones de pesos para los campesinos (CITROFRUT, 2003).

El futuro de la producción cítrica nacional ha sido puesto en riesgo, debido a la presencia de la enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB) la cual es considerada actualmente la enfermedad más destructiva que afecta los cítricos en las zonas productoras del mundo. Dicha enfermedad ingresó al territorio nacional en el año 2009 (Trujillo-Arriaga, 2009).

El HLB también llamado Greening de los cítricos es causado por el patógeno *Candidatus Liberibacter asiaticus*, una bacteria restringida al floema de los cítricos. La transmisión del HLB es causada por el psílido asiático de los cítricos (PAC)

Diaphorina citri el cual, además de ser el principal vector de la enfermedad en América es conocido por causar daño directo en los brotes de los cítricos (Bové, 2006). Si bien el impacto económico de *D. citri* está concentrado en cítricos de importancia comercial, el rango de hospederos de éste insecto se expande a todas las especies de la familia Rutaceae.

La enfermedad del HLB aún no cuenta con cura, es por ello que se recomienda controlar las poblaciones de su vector *D. citri*. Actualmente este control se realiza con insecticidas sistémicos de amplio espectro así como con aceites derivados de petróleo (Rogers et al., 2011). Aunque muchos de estos materiales son efectivos, una dependencia al uso de pesticidas químicos puede acarrear problemas de resistencia a los insecticidas. Es por ello que integrar a los programas de manejo del PAC el control biológico, puede regular el uso intensivo de productos químicos.

El control biológico se ha desarrollado en diferentes áreas, sin embargo el control microbial ha sido el más estudiado y efectivo. Dentro de los patógenos de insectos los hongos son los que han desarrollado un alto interés por su alta eficacia, su capacidad de penetrar la cutícula de los insectos y su considerable amplio rango de hospederos incluyendo insectos chupadores (Lacey, 2001). Muchos de éstos hongos se han encontrado asociados con el psílido asiático de los cítricos, Meyer et al. (2008) aislaron y caracterizaron a el hongo *Isaria fumosorosea* Wize (Hypocreales: Cordycipitaceae) infectando a *D. citri* en Florida. Este hongo es un promisorio candidato para el manejo del psílido, debido a su actual producción comercial así como haber mostrado su patogenicidad contra *D. citri* (Avery et al., 2009). Esta investigación se enfoca a evaluar una cepa del hongo entomopatógeno *I. fumosorosea* contra *D. citri*, con la intención de mostrar el potencial que tiene el control microbial en la lucha contra la dispersión del HLB en México.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la patogenicidad de hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* solo y en mezclas con otros hongos, contra el psílido asiático de los cítricos (PAC) *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) vector de la enfermedad HLB (Huanglongbing).

Objetivos específicos

1.-Determinar la efectividad biológica de *Isaria fumosorosea* en campo contra *Diaphorina citri* así como proporción de micosis en los insectos muertos.

2.-Observar interacción entre *Isaria fumosorosea* cultivado *in vitro* con *Metarhizium brunneum* y *Beauveria bassiana*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Huanglongbing (HLB).

La enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB) del chino que significa, dragón amarillo se debe a la apariencia que adquieren las hojas con los síntomas de esta enfermedad, fue detectada en por primera vez en 1951 en China. Posteriormente se reportó en Sudáfrica, lo que propició que se diseminara a varios países de Asia y África. Hasta el año 2004 no se había tenido ningún reporte de la presencia de esta enfermedad en América. Sin embargo, en ese mismo año se reportó en Brasil (Sao Paulo) y en Septiembre del 2005 se confirma en Florida, EUA. Actualmente la enfermedad se encuentra en muchos países de Centro América (SENASICA, 2010). En México ésta enfermedad se detectó por primera vez en el año 2009 en los estados de Yucatán (Tizimín) y Quintana Roo (Lázaro Cárdenas) respectivamente (Trujillo-Arriaga, 2010). Lo cual ha impulsado medidas fitosanitarias para evitar su dispersión. El Huanglongbing ha ocasionado la muerte de 23 millones de árboles de naranja y mandarina en Asia; 10 millones en África; 3 millones en Brasil y 450 mil árboles en los Estados Unidos (SENASICA, 2010).

El HLB es una enfermedad causada por una bacteria, la cual es causada por tres especies Gram negativas, las cuales son restringidas el floema de los árboles. Estas bacterias pertenecen al género *Candidatus* (*Ca.*) *Liberibacter* (*L.*); *Ca. L. africanus*, la cual es sensible al calor y (20-25 °C) y exclusiva del continente Africano (Bové, 2006). *Ca. L. asiaticus* es tolerante al calor (≤ 32 °C) y está distribuida ampliamente a nivel mundial y su primer reporte en el continente americano fue en Brasil en 2004. *Ca. L. americanus* es sensible al calor (≤ 32 °C), presente solo en Brasil (Taxeira et al., 2005). Dichas bacterias son transmitidas por los insectos

psílicos; *D. citri* Kuwayama para las variedades americana y asiática y *Trioza erytreae* Del Guercio, para la variedad africana.

Sintomatología.

Los síntomas en los árboles infectados por el HLB tienden a variar dependiendo la variedad de cítrico y la edad de la planta afectada. Los síntomas se aprecian claramente en árboles jóvenes y vigorosos, mientras que en los árboles desarrollados, los síntomas son menos marcados (INISAV, 1999). Los síntomas tempranos sobre las hojas incluyen; venas amarillentas y corchosa además de tener una clorosis asimétrica conocida como “moteado asimétrico” (Figura 1). Las hojas pueden verse pequeñas y puntiagudas con una variedad de patrones cloróticos, que a menudo pueden ser confundidos con deficiencias de minerales, como aquellas ocasionadas por falta de zinc, hierro y manganeso. El sistema radicular de los árboles infectados a menudo se encuentra pobremente desarrollado, y los nuevos brotes radiculares pueden encontrarse atrofiados. Los síntomas tempranos en las hojas aparecen por primera vez en un brote o una rama, y con el tiempo se extiende a toda la copa del árbol. En los árboles afectados, el número de frutos producidos se reduce considerablemente y la producción declina en el transcurso de los años, además los frutos producidos son pequeños, a menudo asimétricos (Brlansky et al., 2014). Durante la infección se muestran fuertes floraciones con un pobre cuajado de frutos; se presenta caída prematura de estos y toman una coloración normal en las áreas expuestas al sol, mientras que las otras partes se tornan de una coloración verde-olivo intenso (Gottwald et al., 2007).

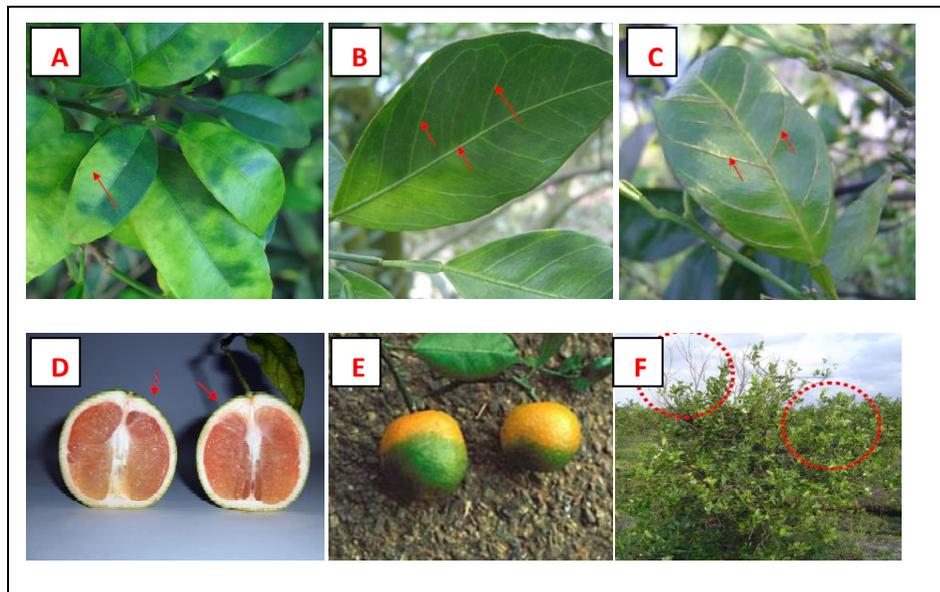


Figura 1. Síntomas de HLB en los árboles infectados. A: Hojas con moteado asimétrico, B: Hojas con aclaramiento de nervaduras, C: Hojas con nervaduras corchosas, D: Frutos deformes, E: Frutos con coloración irregular, F: Amarillamiento y muerte regresiva. Fotos tomadas por Hilda D. Gómez (A y D), Pedro L. Robles (B, C, y F) y por Tim Gotwald (E).

Diagnóstico.

Las formas de *Ca. Liberibacter* comenzaron a identificarse mediante el uso de la microscopía electrónica (ME), la cual fue la primera técnica para la confirmación de la enfermedad HLB infectando árboles (LafLèche y Bové, 1970). Se ha intentado trabajar con metodologías de identificación más prácticas para su diagnóstico sin la necesidad de equipos sofisticados. Uno de estos métodos es el 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 a su 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/OI2c/OA1 los cuales permiten la amplificación de un fragmento de 1160 pares de bases (pb) de las especies asiática y africana. Para diferenciar ambas especies, se lleva a cabo la digestión del producto de amplificación con la enzima *Xba I*, obteniéndose un perfil de restricción de tres fragmentos (520 pb, 506 pb y 130 pb) para la especie africana y dos fragmentos (640 pb y 520 pb) para la forma asiática (Jagoueix et al., 1996). Recientemente Fujikawa et al (2013) desarrollaron otro cebador para la región 16_s denominado Las606/LSS el cual se aplica con una metodología más sencilla, realizando PCR directo con las células bacterianas de las formas, extraídas de las nervaduras centrales de hojas infectadas, dando como resultado una prueba robusta y eficiente para la detección del HLB.

El Psílido Asiático de los Cítricos *Diaphorina citri*.

La citricultura mundial siempre se ha enfrentado a diversos problemas insectiles que afectan y merman la producción cítricola. Sin embargo en los últimos años la citricultura se ve amenazada por dos nuevas plagas que además de causar daños directos a la planta, funcionan como vector de la enfermedad bacteriana conocida como HLB. El psílido asiático de los cítricos (PAC), *D. citri* (Psyllidae) y el psílido africano de los cítricos, *Trioza erytreae* (Trioziidae), (Gullan y Martin, 2009).

El PAC es una plaga que afecta los cultivos cítricos a nivel mundial (Hall, 2008), fue descrito de cultivos cítricos en Shinchiku, Taiwán en 1907. Las especies de *Diaphorina* se separan de acuerdo a al patrón de venación de las alas delanteras

y la forma de las curvas genales. Hay otras seis especies de este género reportadas atacando cítricos: *D. amoena* Capener, *D. auberti* Hollis, *D. communis* Mather, *D. murrayi* Kandasamy, *D. punctulata* Pettey y *D. zebrana* Capener (Halbert y Manjunath, 2004).

Actualmente el PAC es un insecto plaga con categoría cuarentenaria. En México el PAC fue encontrado durante el año 2002 en los estados de Campeche y Quintana Roo, posteriormente, en un periodo de seis años el PAC se encuentra registrado para todas las zonas citrícolas del país desde entonces se ha distribuido ampliamente en todas las áreas citrícolas del país (Miranda-Salcedo y López-Arroyo, 2009). Para el 2014 el PAC es una plaga persistente con la cual los citricultores tienen que tratar, aunado a ello, el riesgo de que el HLB invada todas las áreas productoras cada vez es mayor.

Clasificación taxonómica

Reino: Metazoa.

Phyllum: Arthropoda.

Clase: Insecta.

Orden: Hemíptera.

Suborden: Sternorrhyncha.

Familia: Liviidae.

Subfamilia: Liviinae.

Género: *Diaphorina*.

Especie: *D. citri* Kuwayama.

(Burckhardt y Ouvrard, 2012; NCBI, 2014a)

Biología y ciclo de vida.

El psílido asiático de los cítricos (PAC) presenta un período de vida de 3 a 4 meses aproximadamente y una alta fecundidad, las hembras tienen un período de oviposición de 12 días y pueden llegar a depositar hasta 800 huevecillos durante su ciclo de vida, los cuales eclosionan a los 3 días en verano y 23 días en invierno. El ciclo completo es de 15-47 días (Figura 2), pudiendo existir hasta 11 generaciones por año, como es el caso del área de Guangdong, China (Yang et al., 2006).

Tsai y Liu, (2000) mencionan que las hembras de *D. citri* sólo ovipositan en ramas tiernas y en ausencia de estas, cesan la oviposición temporalmente. Sin embargo el PAC sobre plantas en invernadero, cuando estas cesan la producción de brotes en invierno las hembras ovipositan en el borde de las hojas maduras, así como algunas ninfas de 1er instar se encuentran alimentándose en las mismas (Observación personal). Las ninfas excretan una sustancia blanquecina cerosa a manera de hilos que deposita sobre las hojas y brotes.

Los factores determinantes del incremento de los niveles poblacionales del PAC son; la temperatura, humedad relativa y el contenido nutricional de las hojas. El PAC no presenta diapausa aunque sus poblaciones declinan considerablemente en invierno (época seca). Los adultos se alimentan en una posición inclinada con la cabeza pegada al sustrato y el cuerpo levantado, y brincan cortas distancias cuando son molestados. Esta es una característica para identificarlos. Los adultos del PAC pueden vivir varios meses esperando brotaciones de los cítricos o plantas hospedantes para iniciar la reproducción (Halbert and Manjunath, 2004; Martínez-Carrillo, 2009).

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

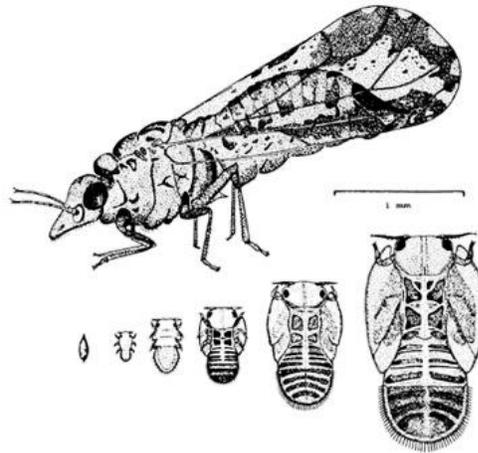


Figura 2. Ciclo de vida de *Diaphorina citri*.

Morfología.

Huevos: Los huevecillos son de color amarillo claro brillante (cuando recién depositados) y se tornan a brillante anaranjado al pasar el tiempo (Figura 3). Presentan una forma ovoide, con una prolongación alargada hacia una de las puntas. Miden aproximadamente 0.30 mm de longitud y 0.14 mm de ancho. Los huevecillos son colocados generalmente en los brotes tiernos (Tsai y Liu, 2000).



Figura 3. Huevecillos de *Diaphorina citri*. Fuente: David Hall.USDA-ARS. Bugwood.org

Ninfas: El PAC posee un ciclo de vida con cinco estadios ninfales (Figura 4), las ninfas de primer estadio miden aproximadamente 0.25 mm de longitud, mientras que las de quinto instar miden de 1.5 a 1.7 mm de longitud. El último instar se caracteriza por presentar los primordios alares de mayor tamaño. El color de las ninfas es por lo general naranja amarillento, no tienen manchas abdominales, son aplanadas dorso ventralmente, un par de ojos rojos compuestos y dos antenas de color negro. Presentan filamentos a lo largo del abdomen. Se alimentan de tejidos tiernos y pueden doblar las hojas en desarrollo para protegerse durante el proceso de alimentación (Martínez- Carrillo, 2009).



Figura 4. Instares ninfales de *Diaphorina citri*. Fuente: David Hall. USDA-ARS. Budwood.org.

Adultos: Los psílidos varían de 3 a 4 mm de longitud, un cuerpo con moteado color café. La cabeza es café claro (Figura 5). El ala delantera es más amplia en parte media apical, moteada, y con una banda extendida alrededor de la periferia de la zona posterior del ala. Esta banda esta ligeramente interrumpida cerca del ápice. Las antenas tienen puntas de color negro con dos pequeños puntos en medio de los segmentos. Usualmente el adulto está cubierto de una sustancia cerosa. Los machos son levemente más pequeños que las hembras, el abdomen de la hembra termina en una punta bien marcada, se torna rojizo o anaranjado antes de ovipositar (Mead, 1998).



Figura 5. Características del adulto de *Diaphorina citri*. Fotografía por Jeffrey Lotz, FDACS-Division of Plant Industry.

Importancia de *Diaphorina citri*.

D. citri causa dos principales de daños en los árboles de cítricos. Un daño directo y el otro indirecto; El daño directo lo causa debido a sus altas poblaciones, las cuales se alimentan de la savia de los brotes tiernos marchitándolos, provocando defoliación y la muerte progresiva de estos (Figura 6). Así mismo sus altas infestaciones originan abundantes secreciones de mielecilla que favorece la

presencia y desarrollo de la fumagina, la cual afecta el vigor de los árboles al limitar la fotosíntesis de las hojas (Halbert y Manjunath, 2004). El daño indirecto lo causa como vector de la enfermedad del Huanglongbing de los cítricos (HLB) la cual es considerada la plaga más devastadora de los cítricos aún más que la tristeza de los cítricos (da Graça y Korsten, 2004).

Como resultado de los daños que este insecto causa y el alcance que ellos tienen en la citricultura mexicana, representa una seria amenaza para la producción futura. Debido a que México se posiciona en la actualidad como uno de los principales productores y exportadores de cítricos a nivel mundial.



Figura 6. Daño directo de *Diaphorina citri* en brotes de cítricos, causando deformación de las hojas.

Control del Psílido Asiático de los Cítricos (PAC).

Existe diversos métodos y estrategias en el control del PAC, ya sea controlando la dispersión del vector o controlando las fuentes de inóculo de la enfermedad, así mismo aquellas que se integran en un manejo integrado la diseminación del inóculo. La estrategia actual se encuentra enfocada en el control del vector. En este esquema

se manejan las tácticas de control desarrolladas para contener el daño por el complejo PAC-HLB; Control biológico, control químico, control legal, prácticas culturales, control genético biotecnología y métodos etológicos (Martínez-Carrillo, 2009).

Control químico.

En la industria citrícola actual mucho se ha trabajado en el control del PAC con la aplicación de productos químicos. Se han utilizado insecticidas como dimetoato, aldicarb, monocrotofos, deltametrín, cipermetrina, clorpirifós, diclorvos, endosulfán y malatión con resultados hasta 90% en la reducción de la plaga por 7 días después de las aplicaciones (Bové, 1986; Dahiya et al., 1994). También se ha aplicado metamidofós, imidacloprid, abamectina, Neem (*Azadirachta indica*) y aceites minerales (Kumar et al., 2005; Yang et al., 2006; Srinivasan et al., 2008; Cocco y Hoy, 2008).

En Brasil, los insecticidas que han ejercido un buen control sobre el psílido asiático de los cítricos son productos sistémicos en períodos de lluvia y de movimiento de savia como lo son el Aldicarb y el Imidacloprid (Childers y Rogers, 2005).

Control biológico.

El uso de plaguicidas para el control de insectos plaga anteriormente era factible para el manejo de estos, sin embargo ante la evidencia del daño que estos causan en el medio ambiente por la alta residualidad de varios de ellos, existe una tendencia mundial de conversión del manejo de plagas convencional, al manejo

integrado de plagas dentro del cual destaca por su efectividad y su interacción con la ecología, el control biológico (Hoddle y Van Driesche 2009).

Existe una gran diversidad de enemigos naturales del psílido asiático de los cítricos, muchos de ellos son, arácnidos, crisópidos, sírfidos y coccinélidos, por mencionar algunos depredadores, sin embargo dentro del control también se encuentran los parasitoides como la *Tamarixia radiata* y hongos patógenos que infectan al psílido (p. ej. Hypocreales).

Parasitoides

El género *Tamarixia* (Hymenoptera: Eulophidae) se reportó por primera vez en Tamaulipas, atacando a *D. citri* en hojas de lima mexicana (Coronado et al., 2003; Ruíz et al., 2004).

Depredadores

Varios depredadores principalmente coccinélidos y crisópidos, se han encontrado alimentándose sobre *D. citri*. También se han observado depredadores como *Chilocorus cacti*, *Olla v-nigrum* y *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) (Pluke et al., 2005; Michaud, 2001). Así mismo *Exochomus cubensis*, *Scymnus distinctus*, *Curinus sp.* (Coleoptera: Coccinellidae) y *Chrysoperla sp.*, *Ceraeochrysa sp.* (Neuroptera: Chrysopidae) (Matínez-Carrillo y Cortez- Mondaca, 2008).

Hongos entomopatógenos

Dentro de los patógenos más eficientes usados en el control microbial se encuentran los hongos entomopatógenos los cuales deben su eficiencia a la capacidad que poseen de penetrar la cutícula de los insectos, invadir el hemocele y ocasionar la muerte rápida debido a la liberación de toxinas. Cuando el hongo

esporula, frecuentemente ocasionan epizootias que reducen significativamente las poblaciones de los insectos plaga (Gullan y Cranston, 2010).

Se conocen más de 100 géneros y 700 especies, pero poco más de 10 han sido empleadas en el control biológico de insectos. Entre los más importantes se destacan; *Beauveria*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Entomophthora*, *Aschersonia*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Isaria* y *Lecanicillium* (Hajecck y St. Leger, 1994). Muchos de éstos hongos se han reportado que atacan naturalmente al psílido asiático de los cítricos, entre éstos se encuentran; *Cephalosporium lecanii* Zimm (= *Lecanicillium lecanii*), *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Hirsutella citriformis* Speare e *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) Wize (Rivero-Aragon and Grillo-Ravelo, 2000; Meyer et al., 2008).

***Isaria fumosorosea* Wize.**

Este hongo primeramente descrito como *Paecilomyces fumosoroseus* por M. Wize en 1904. Fue primeramente aislado de un inmaduro del escarabajo de la remolacha azucarera en Ucrania. *I. fumosorosea* es comúnmente encontrado en el suelo, pero también ha sido reportado de plantas, agua y menos comúnmente en el aire. (Zimmerman, 2008).

Por su amplio rango de hospederos *I. fumosorosea* ha recibido mucha atención como posible agente de control biológico para muchos insectos plagas económicamente importantes de cultivos agrícolas (Kim et al., 2010). Mucha de ésta investigación ha sido enfocada en el control de moscas blancas (*Bemisia tabaci*), pero recientemente ha sido evaluado como agente de control del Psílido Asiático de los Cítricos (*Diaphorina citri*) el cual disemina la bacteria patógena que ocasiona el huanglongbing (Dalleau-Clouet, 2005; Hoy et al., 2010).

Clasificación taxonómica.

Reino: Fungi.

División: Ascomycota.

Clase: Sordariomycetes.

Subclase: Hypocreomycetidae.

Orden: Hypocreales.

Familia: Cordycipitaceae.

Género: *Isaria*.

Especie: *I. fumosorosea*.

(Luangsa-ard et al., 2005; Sung et al., 2007; Humber et al., 2011; NCBI, 2014b).

Características de *Isaria fumosorosea* Wize.

El género *Isaria* presenta un crecimiento rápido, con colonias miceliales de color blancas, las cuales pueden tornar de un color púrpura o rosa grisáceo, produciendo sinemas rosas. *I. fumosorosea* presenta hifas hialinas a amarillentas, septadas y con paredes lisas. Las fiálides en ramas divergentes las cuales constan de una porción basal cilíndrica o hinchada, adelgazándose abruptamente a menudo para formar un cuello muy notorio (Figura 7). Los conidióforos usualmente bien desarrollados llevan cadenas de conidias; éstas son de ovoides a alargadas, hialinas a ligeramente coloreadas y unicelulares (Bustillo 2001; Zimmerman, 2008).

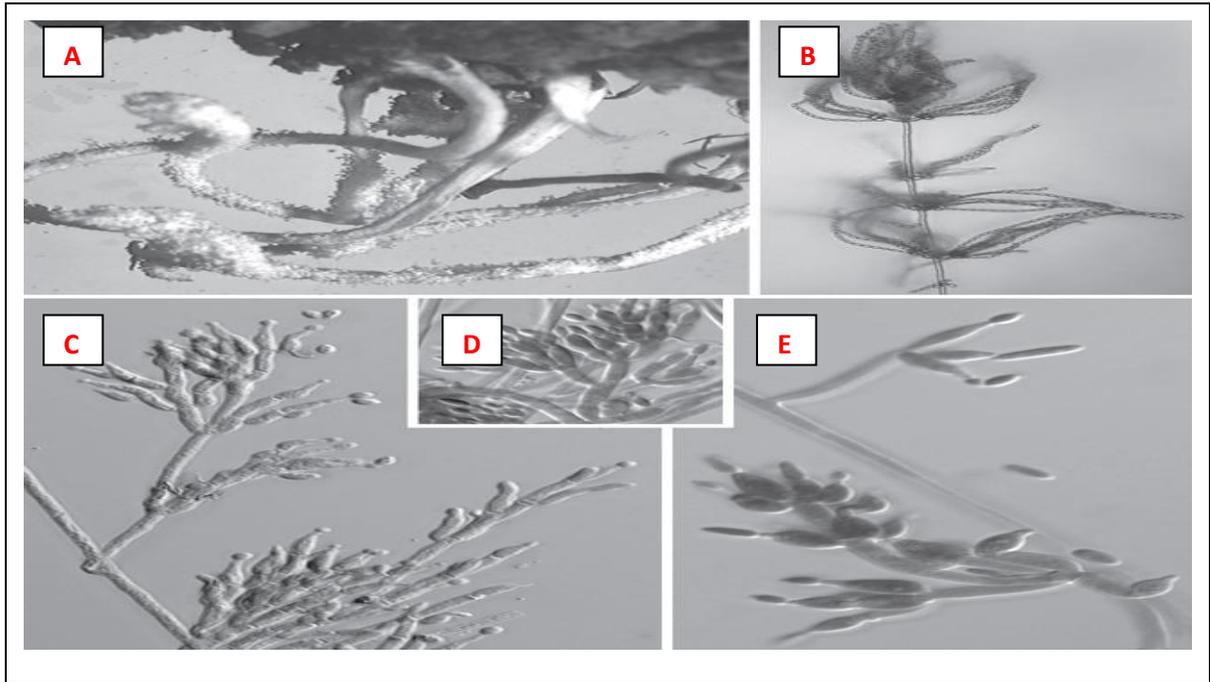


Figura 7. *Isaria*; A: Sinemas. B: Racimo de cadenas conidiales divergentes. C, D y E: Celulas de los conidióforos (fiálides) con la base hinchada y con prominentes cuellos llevando conidias. Fotos por Richard A. Humber.

Modo de acción.

Isaria fumosorosea infecta a sus huéspedes infringiendo en la cutícula. Varios metabolitos permiten al patógeno que físicamente pueda penetrar su huésped así como también inhibir su sistema defensivo. Este hongo trabaja con enzimas como las proteasas, quitinasas y lipasas, estas enzimas permiten al hongo penetrar dentro del insecto y dispersarse dentro del hemocele. *I. fumosorosea* y otras especies dentro de éste género también producen beavericina (Luangsa et al., 2009), un compuesto que aparece para paralizar las células del hospedero (Hajek and Leger, 1994).

Muchos factores tanto bióticos como abióticos, influyen el crecimiento, estabilidad y patogenicidad de *I. fumosorosea*, estos incluyen; temperatura, humedad relativa, radiación y la planta hospedera del insecto plaga (Zimmerman, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización.

El presente trabajo de investigación se realizó de Octubre del 2013 a Mayo del 2014 en dos fases. La primera se llevó a cabo en el laboratorio y en las cámaras bioclimáticas siete y ocho del departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México y la segunda fase corresponde a la aplicación de hongos entomopatógenos en campo, esta fase fue dividida en dos, la primera parte correspondiente a la formulación del producto biológico se realizó en el laboratorio del Campo Experimental General Terán perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). La segunda parte correspondiente a la aplicación de entomopatógenos en campo, se realizó en 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.

Obtención de las cepas.

Para la realización de este trabajo se utilizaron tres hongos entomopatógenos. A continuación se mencionan los datos de aislamiento para cada cepa

a) *I. fumosorosea* Wize (cepa IF8B19), aislado de *D. citri* en San Pedrito, Gómez Farías, Tamaulipas, México (22°59'33"N, 99°8'34.82"W).

b) *M. brunneum* Petch (cepa 6M11), aislado de suelo agrícola mediante la técnica propuesta por Sánchez-Peña et al. (2011) en el Yerbaniz, Santiago, Nuevo León, México (25°30'04"N, 100°11'40"W).

c) *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin (cepa B6C), aislado de un chapulín presentando signos de infección por entomopatógenos en campos agrícolas de la UAAAN-Salttillo, Coahuila, México (25°21'30"N, 101°02'20"W).

Para la purificación de las capas, 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 minuto en hipoclorito de sodio al 10%, 30 segundos en alcohol al 70%, 1 minuto en agua estéril, 1 minuto en estreptomycin 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 *Isaria fumosorosea* en medio de cultivo artificial.

Los tres hongos entomopatógenos utilizados en este trabajo, fueron incrementados en el medio de cultivo PDAL, el cual fue preparado utilizando 39 g de PDA en un matraz Erlenmeyer por cada litro de agua, más 5 g de levadura, posteriormente fue esterilizando a 121°C y 15 lbs de presión durante 15 minutos. Después el PDAL fue vaciado en cajas Petri de 9cm de diámetro bajo condiciones estériles y las cajas Petri fueron selladas y almacenadas a 4°C hasta su utilización. Para preparar el medio de cultivo PDA, se utilizó la marca comercial MCD LAB® (200 g de infusión de papa, 20 g de dextrosa y 15 g de agar bacteriológico) y para la levadura se usó la marca comercial Nevada® SAFMEX.

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

estéril en forma de zig-zag 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.

Técnica analíticas.

Conteo de esporas.

Todos los conteos para realizar los bioensayos fueron llevados a cabo con una cámara de Neubauer (hemocitómetro) en un microscopio a 400x, siguiendo la metodología de Goettel e Inglis (1994).

Prueba de viabilidad.

Esta fase se determinó evaluando la germinación de las esporas. Para esta evaluación se preparó una suspensión de *I. fumosorosea* utilizando una concentración de 1.0×10^7 conidios mL^{-1} . De esta suspensión se tomó 0.5 mL y se esparcieron en cajas Petri con medio de cultivo (PDAL). Las observaciones se realizaron después de 24 h en un microscopio a 40x contabilizando 100 esporas en un campo óptico. Los conteos se repitieron en las cinco cajas para obtener un promedio más certero.

Aplicación de *Isaria fumosorosea* en campo.

Se utilizaron tres tratamientos, en el primer tratamiento se cosecharon conidias de *I. fumosorosea* directamente de cajas Petri y fueron suspendidas en agua estéril con surfactante Bionex (0.05% v/v). La concentración de conidios fue determinada con una cámara de Neubauer ajustando a 1.19×10^8 conidios viables.mL⁻¹. El segundo tratamiento fue una mezcla de hongos entomopatógenos; *I. fumosorosea* (IF8B19), *M. brunneum* (6M11) y *B. bassiana* (B6C), ajustados a una concentración de 1.4×10^8 conidios viables.mL⁻¹, divididas entre los tres hongos en partes iguales, y por último un tratamiento de agua estéril más surfactante Bionex (0.05% v/v) como control (cuadro 1). Pruebas de germinación fueron realizadas para los tratamientos fúngicos con la metodología antes descrita.

La aplicación fue realizada el 16 de Octubre de 2013 a las 4 pm con una temperatura media de 22.62 °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 permiten ventilación pero no salida de los insectos, conteniendo 20 psílidos cada una. Durante la evaluación se utilizaron 39 bolsas las cuales fueron colocadas en 20 árboles de naranja Valencia (*Citrus sinensis* var. Valencia) de aprox. 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 del lado norte y la otra del lado sur de la copa del árbol. El diseño experimental se consideró como completamente al azar. Se utilizaron 13 de éstas mallas para cada tratamiento y se asperjaron con un atomizador de mano (Viton®), 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. Lo anterior se realizó para cada tratamiento.

Cuadro 1. Tratamientos aplicados contra *Diaphorina citri* en brotes de *Citrus sinensis* var. Valencia en General Terán, Nuevo León, México.

Tratamiento	N	Concentración	Cepa	Forma infectiva
Control Bionex	13	0.05% v/v	-	-
<i>Isaria fumosorosea</i>	13	1.19 x 10 ⁸ *	IF8B19	Conidia aérea
Mix tres hongos entomopatógenos	13	1.40 x 10 ⁸	B6C,6M11,IF8B19	Conidia aérea

*Concentración dada en conidios·mL⁻¹

Interacción de *Isaria fumosorosea* con dos hongos entomopatógenos *in vitro*.

Los hongos; *I. fumosorosea*, *M. brunneum* y *B. bassiana* fueron previamente cultivados en PDA para obtener inóculo micelial suficiente para el bioensayos. Tres días después se cortaron discos de 9 mm de diámetro con un sacabocados, éstos discos fueron tomados de la orilla de cada colonia fúngica. Cada confrontación fue probada con 12 repeticiones (cuadro 2). Los explantes para cada hongo fueron combinados en nuevas cajas Petri con PDAL como medio de cultivo y separados por 20 mm de cada disco fúngico a confrontar. Las cajas Petri fueron guardadas a una temperatura de ±25 °C. El crecimiento radial de cada hongo fue medido diariamente

con dirección al otro crecimiento fúngico por 5 días para obtener al final un promedio de crecimiento radial diario, el cual se analizó con un diseño completamente al azar.

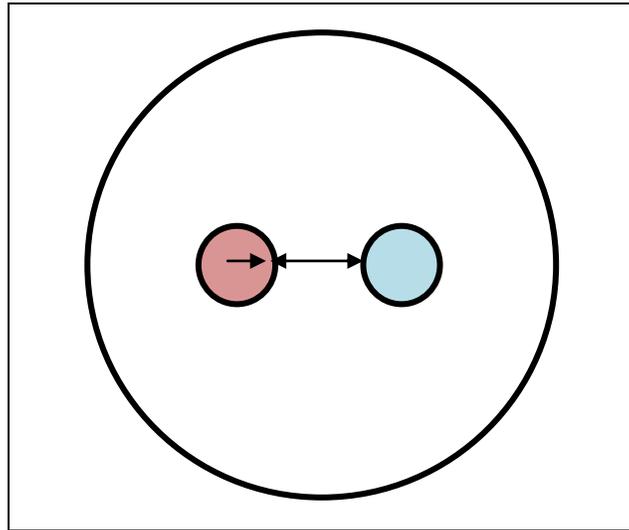


Figura 8. Diagrama de las confrontaciones *in vitro*. Explantes (rojo y azul) distanciados a 20 mm. La medida de crecimiento radial diario fue tomada del centro de cada disco micelial en dirección al otro.

Cuadro 2. Tratamientos (confrontaciones) para la prueba de interacción de *I. fumosorosea* con otros hongos entomopatógenos en laboratorio.

Tratamientos	Cepas	N
<i>I. fumosorosea</i> control	IF8B19	12
<i>I. fumosorosea</i> - <i>M. brunneum</i>	IF8B19-6M11	12
<i>I. fumosorosea</i> - <i>B. bassiana</i>	IF8B19-B6C	12

Análisis de los datos.

La mortalidad inducida de los tratamientos en la aplicación de campo contra los psílidos fue corregida con la fórmula de Schneider-Orelli y posteriormente los datos estandarizados a proporciones (0-1). Los datos del bioensayo *in vitro* fueron variables continuas (mediciones). Los datos fueron manejados para reunir los supuestos del ANOVA de una vía.

Todos los datos fueron previamente probados para normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk; al no cumplirse este requisito se realizaron transformaciones de los datos, arcoseno ($\text{Sen}^{-1}(\sqrt{x})$) para proporciones y raíz cuadrada (\sqrt{x}) para las mediciones. Así mismo la homogeneidad de varianzas fue probada para cada experimento con la prueba de Levene, los valores del estadístico F y los grados de libertad fueron corregidos con Brown-Forsythe (Zar, 2010). Las comparaciones múltiples se realizaron de acuerdo a la prueba de Games-Howell no asumiendo varianzas iguales. Todas las pruebas y análisis fueron realizados con el paquete estadístico (SPSS para Windows V.19).

RESULTADOS

Aplicación de *Isaria fumosorosea* en campo.

Los tratamientos fúngicos evaluados presentaron porcentajes de germinación; para *I. fumosorosea* 99% y para el Mix de tres hongos entomopatógenos se registró un 100%. Ambos tratamientos fúngicos fueron patogénicos para el psílido asiático de los cítricos a una concentración de $1.19-1.4 \times 10^8$ conidios·mL⁻¹. El control Bionex obtuvo una mortalidad de 44.9%. Los dos tratamientos fúngicos no fueron estadísticamente significantes entre ellos $F_{1,24} = 0.914$, $P = 0.349$, (Cuadro 3). Obteniendo para el hongo *I. fumosorosea* una mortalidad corregida de 32.67% y para

el mix de los tres hongos entomopatógenos 44.20% de insectos muertos (Figura 9). Los intervalos de confianza obtenidos, muestran las estimaciones de las medias al 95% (Cuadro 4).

Cuadro 3. Medias de la mortalidad corregida (\pm Error estándar, SEM) e intervalos de confianza al 95% de los tratamientos contra *Diaphorina citri*.

Tratamientos**	Concentración	Media de Mortalidad (\pm EE)	95% IC	
			Límite inferior	Límite superior
<i>Isaria fumosorosea</i>	1.2 x 10 ⁸	32.67 \pm 9.97 a*	10.93	54.41
Mix tres hongos entomopatógenos	1.4 x 10 ⁸	44.20 \pm 9.18 a	24.19	64.22

*Medias de mortalidad con diferente letra indica diferencia significativa en base a Intervalos de confianza al 95% que no se traslapan.

**El control Bionex (0.05% v/v) obtuvo una mortalidad de 44.9% la cual fue corregida de acuerdo a la fórmula de Schneider-Orelli.

Cuadro 4. Análisis de varianza de la aplicación de hongos entomopatógenos contra *Diaphorina citri* en en brotes de *Citrus sinensis* var. Valencia.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P<0.05
Tratamientos	1	0.218	0.218	0.914	0.349
Error	24	5.737	0.239		
Total	25	5.955			

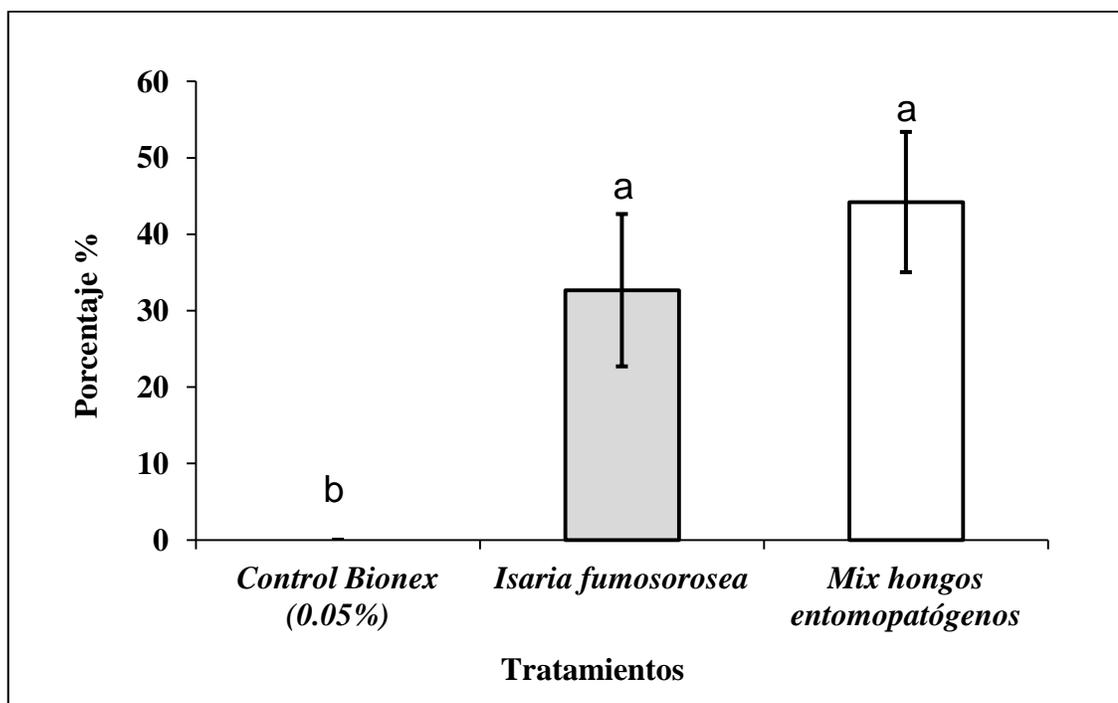


Figura 9. Promedio de mortalidad corregida (\pm Error estándar, SEM) de los tratamientos contra *Diaphorina citri* en campo, letras diferentes sobre las barras de error indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al no traslape de IC 95%.

El porcentaje de esporulación sobre los psílicos en general fue $>22\%$ para los tratamientos fúngicos. El control Bionex no presentó insectos micosados. No hubo diferencia estadística entre los dos tratamientos de entomopatógenos $F_{1,17.344} = 0.051$, $P = 0.825$ después de 3 semanas post-aplicación (Cuadro 5). El tratamiento de *I. fumosorosea* obtuvo 28.35% de insectos micosados (esporulación) y la formulación del mix de los tres hongos obtuvo una porcentaje de 22.05% (Cuadro 6 y Figura 10). La esporulación de la formulación del mix de hongos fue cuantificada para cada especie; *B. bassiana* 58.3%, *I. fumosorosea* 41.7% (Datos no mostrados) y para *M. brunneum* no se observó presencia de éste hongo en los cadáveres provenientes de la formulación mixta.

Cuadro 5. Medias de los porcentajes de psílicos micosados (\pm Error estándar, SEM) e intervalos de confianza al 95%.

Tratamientos	Concentración	Media de Micosados (\pm EE)	95% IC	
			Límite inferior	Límite superior
<i>Isaria fumosorosea</i>	1.2 x 10 ⁸	28.35 \pm 6.16 a*	14.93	41.78
Mix tres hongos entomopatógenos	1.4 x 10 ⁸	22.05 \pm 3.36 a	14.72	29.37

*Medias de mortalidad con diferente letra indica diferencia significativa en base a Intervalos de confianza al 95% que no se traslapan.

Cuadro 6. Análisis de varianza de la esporulación de los hongos entomopatógenos sobre *Diaphorina citri*, evaluado tres semanas post-aplicación.

	Grados de libertad*	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Brown-Forsythe	P<0.05
Tratamientos	1	0.003	0.003	0.051	0.825
Error	17.34	1.586	0.066		
Total	25	1.589			

*Los grados de libertad del error esta dado en decimales debido a la utilización del ANOVA modificado por Brown-Forsythe para varianzas disímiles.

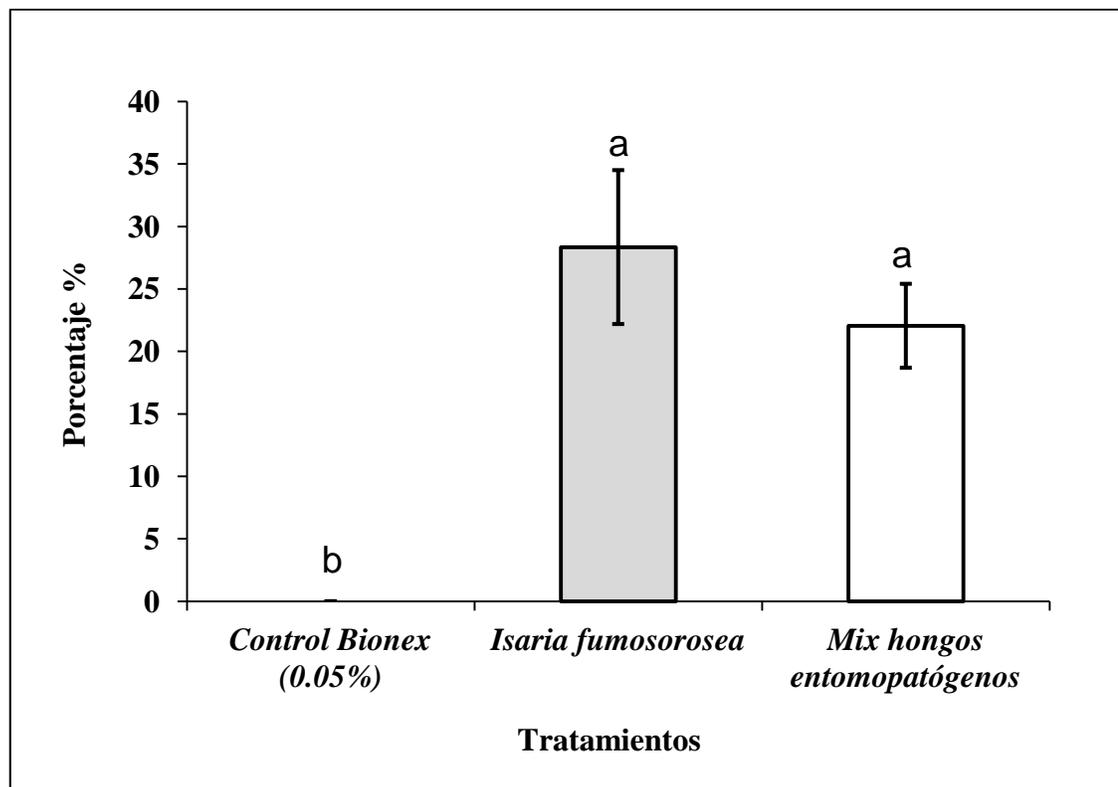


Figura 10. Promedio de Porcentajes de micosis (\pm Error estándar, SEM) sobre *Diaphorina citri* tres semanas post-aplicación, letras diferentes sobre las barras de error indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al no traslape de IC 95%.

Interacción de *Isaria fumosorosea* con dos hongos entomopatogenos *in vitro*.

La interacción de los hongos; *B. bassiana* y *M. brunneum* con respecto a *I. fumosorosea* fue diferente para cada tratamiento. El control (*Isaria* sólo) obtuvo promedio de crecimiento diario de 1.24 mm., el cual en general fue menor comparado con el crecimiento en conjunto con los otros hongos. La confrontación de *I. fumosorosea*-*M. brunneum* obtuvo un crecimiento de 1.46 mm.día⁻¹ para *Isaria*. Para la confrontación de *I. fumosorosea*-*B. bassiana* el crecimiento fue de 1.96 mm.día⁻¹ para *Isaria* (Cuadro 7 y figura 11). Los tratamientos fueron significativamente diferentes entre ellos, $F_{2,22.658} = 5.079$, $P = 0.015$ (Cuadro 8). De

acuerdo a la separación de medias (Gomes-Howell) *I. fumosorosea* creció más rápido cultivado en conjunto con *B. bassiana* que incluso cultivado solo.

Cuadro 7. Medias de crecimiento radial diario (\pm Error estándar, SEM) para cada confrontación (tratamiento).

Tratamiento	N	Media de crecimiento radial diario** (\pm EE)	95% IC	
			Límite inferior	Límite superior
<i>I. fumosorosea</i> control	12	1.24 \pm 0.06 b*	1.10	1.38
<i>I. fumosorosea</i> - <i>M. brunneum</i>	12	1.46 \pm 0.14 ab	1.14	1.79
<i>I. fumosorosea</i> - <i>B. bassiana</i>	12	1.96 \pm 0.23 a	1.45	2.48

*Medias de crecimiento radial diario con diferentes letras indican diferencia significativa de acuerdo a Games-Howell.

**Se refiere al media real y está dada en milímetros.

Cuadro 8. Análisis de varianza del crecimiento radial diario de las confrontaciones de *Isaria fumosorosea* con otros hongos *in vitro*.

	Grados de libertad*	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Brown-Forsythe	P<0.05
Tratamientos	2	0.439	0.220	5.079	0.015
Error	22.65	1.427	0.043		
Total	35	1.866			

*Los grados de libertad del error esta dado en decimales debido a la utilización del ANOVA modificado por Brown-Forsythe para varianzas disímiles.

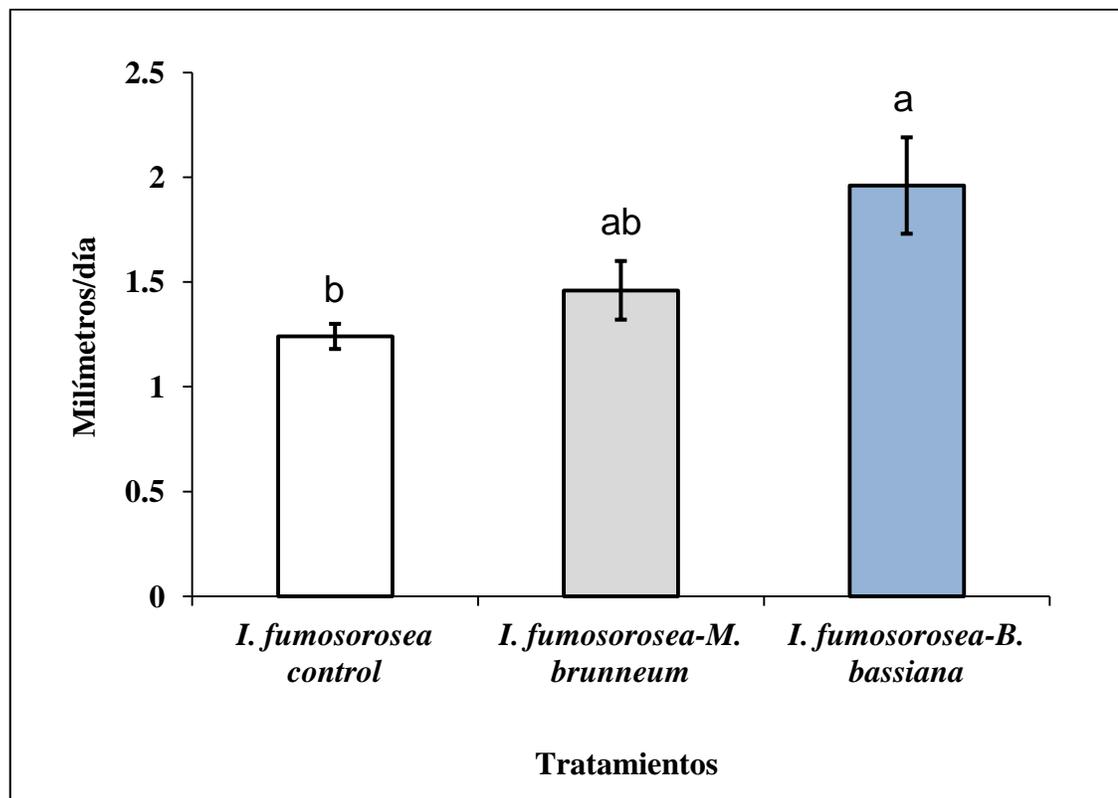


Figura 11. Medias de crecimiento radial diario (\pm Error estándar, SEM) para cada confrontación. Letras diferentes sobre las barras de error indican diferencia significativa de acuerdo a Games-Howell.

DISCUSIÓN

La investigación científica y tecnológica del aprovechamiento del *I. fumosorosea* Wize ha ganado atención en el control de insectos plaga en los últimos años debido a su efectividad contra especies de hemípteros, con una notable cantidad de cepas para comercializar (Faria y Wraight 2007). También ha mostrado su potencial ayudando a controlar el psílido asiático de los cítricos con un mínimo impacto sobre artrópodos benéficos (Avery et al. 2013). La evaluación de nuevas cepas de éste hongo contra el psílido asiático de los cítricos sigue recabando información relevante

para el desarrollo de nuevas formulaciones que controlen el vector del HLB en México.

Los datos presentados en este estudio muestran el potencial del hongo entomopatógeno *I. fumosorosea* como herramienta en el programa de manejo integrado del psílido asiático. La cepa mostró mortalidades en campo mayores a 30 %, mientras que Moran et al. (2011) encontraron una mortalidad en invernadero con otro método de aplicación menor al 40%, un resultado similar. La mortalidad por *I. fumosorosea* en éste trabajo se puede considerar como un porcentaje aceptable debido al nulo efecto tóxico-residual, comparado con los insecticidas químicos. Así mismo debido al papel que juegan los hongos entomopatógenos como herramienta en el manejo de la resistencia, lo cual muchos de los pesticidas químicos usados actualmente en el control del psílido pueden acarrear con su uso intensivo (Qureshi y Stansly 2009; Tiwari et al. 2011). Los psílicos muertos por *I. fumosorosea* mostraron un porcentaje de esporulación menor al 29%, sin embargo su efectividad puede mejorar con sinergismo de aceites y otros coadyuvantes al mejorar la adhesión de los conidios sobre el tegumento de los insectos (Inglis et al. 2000). El poco porcentaje de infección en los psílicos adultos podría deberse al uso de una metodología inconveniente. Por ejemplo el uso de bolsas de mallas con la parte media provistas de plástico, las cuales pudieron incrementar considerablemente la temperatura dentro estas, acelerando la mortalidad de los psílicos previo a la infección por *I. fumosorosea*.

En muchas ocasiones diferentes hongos entomopatógenos se aplican mezclados sin tener conocimiento de la interacción entre ellos (Morales-Reyes et al. 2014), además existe escasa información acerca de éstas interacciones, ya sea a nivel formulación o *in vivo*, teniendo desconocimiento de sinergismo o antagonismo entre especies de hongos entomopatógenos. Mahmoud (2009) encontró sinergismo cuando mezcló *B. bassiana* más *M. anisopliae* sobre *Bactrocera oleae*, sin embargo también registró un efecto antagonista cuando aplicó *Lecanicillium lecanii* junto con los dos hongos anteriormente mencionados. El tratamiento mix de tres hongos (*I. fumosorosea*, *B. bassiana* y *M. brunneum*) usado en este trabajo experimental no

mostró ningún efecto de sinergismo o antagonismo sobre la mortalidad de adultos de *D. citri*, obteniendo una mortalidad mayor de 44 % los cuales son estadísticamente similar a la obtenida por *I. fumosorosea* cuando se aplicó solo. Nuñez et al. (2008) tampoco encontró ningún efecto sinergista cuando aplicó *I. fumosorosea* en conjunto con *L. lecanii* sobre *Aleurodicus cocois*.

En el tratamiento Mix de hongos entomopatógenos, se observó únicamente esporulación de *I. fumosorosea* y *B. bassiana*, mientras que *M. brunneum* no mostró ninguna señal de esporulación. Guzmán-Franco et al. (2009) tampoco observó esporulación de *Pandora blunckii* cuando fue inoculado conjuntamente con *Zoophthora radicans* en larvas de *Plutella xylostella*, sugiriendo una lucha por competición durante el crecimiento vegetativo entre estas especies fúngicas.

Para observar algún efecto de inhibición de *I. fumosorosea* sobre *M. brunneum*, la confrontación de estos hongos fue llevada a cabo *in vitro*. No se observaron halos de inhibición entre todas las confrontaciones, sin embargo, *I. fumosorosea* inhibió el crecimiento de *M. brunneum*. El crecimiento micelial de *I. fumosorosea* fue más rápido al confrontarlo con *B. bassiana* (17%) y *M. brunneum* (58%) que al sembrarlo solo. Estos resultados sugieren que probablemente *I. fumosorosea* se ve más presionado a competir por espacio, nutrientes y en dado caso por huésped en presencia de otros hongos entomopatógenos, como lo observado por Guzmán-Franco et al. (2011) en el comportamiento de *Z. radicans*, el cual incrementa sus recursos para crecer más rápido dentro de larvas de *P. xylostella* para competir con *P. blunckii* por espacio. En la aplicación en campo, *B. bassiana* probablemente se comportó igual a *I. fumosorosea* creciendo rápidamente para competir por espacio (huésped) en comparación de *M. brunneum*, y por ésta causa estos dos hongos reflejaron su competitividad en un mayor número de hospederos (psílicos) esporulados. Gundannavar et al. (2003) realizaron un estudio similar con otros hongos entomopatógenos, encontrando una inhibición entre especies debida a la rapidez de crecimiento, como la mostrada por *I. fumosorosea* en esta prueba. Podemos sugerir en base a éste estudio preliminar que *I. fumosorosea* es apto para

formularse conjuntamente con *B. bassiana*, sin embargo, *M. brunneum* no es un buen candidato para ésta clase de formulaciones mixtas.

CONCLUSIÓN

El hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* cepa IF8B19 es un buen candidato para utilizarse en un programa de manejo integrado del psílido asiático de los cítricos, debido a su especificidad y virulencia. Además de sus índices de mortalidad en campo, también presenta capacidad de formularse en conjunto con *B. bassiana* sin perder vigor, el cual podría considerarse un factor importante en el desarrollo de productos. Se requiere realizar más investigación en esta área para el desarrollo de formulaciones exitosas en campo.

LITERATURA CITADA

- Avery, P. B., Hunter, W. B., Hall, D. G., Jackson, M. A., Powell, C. A., and Rogers, M. R. 2009. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) infection and dissemination of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) under laboratory conditions. Florida Entomologist. 92: 608-618.
- Avery, P. B., Pick, D. A., Aristizábal, L. F., Kerrigan, J., Powell, C. A., Rogers, M. R., Arthurs, S. P. 2013. Compatibility of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) blastospores with agricultural chemicals used for management of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). Insects. 4: 694-711.
- Bové, J. M. 1986. Greening in the Arabian Peninsula. Toward New Techniques for Its Detection and Control. FAO Plant Protection. Bulletin. 34: 7-15.
- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: A Destructive, Newly-Emerging, Century-Old Disease of Citrus. Journal of Plant Pathology. 88: 7-37.
- Brlansky, R. H., Dewdney, M. M., Rogers, M. E. 2014. 2014 Florida Citrus Pest Management Guide: Huanglongbing (Citrus Greening). University of Florida/IFAS EDIS. [En línea] disponible en: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/CG/CG08600.pdf>> [Consulta: 19 Febrero 2015].
- Burckhardt, D., and Ouvrard, D. 2012. A Revised Clasification of the Jumpng Plant-Lice (Hemiptera: Psylloidea). Zootaxa. 3509: 1-34.

Bustillo, A. 2001. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: Seminario Uso de de entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá. Pg. 30-53.

Childers, C. C., and Rogers, E. M. 2005. Chemical Control and Management Approaches of the Asian Citrus Psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psilidae) in Florida Citrus. Proceedings of Florida State Horticultural Society. 110: 49-53.

CITROFRUT. 2003. Citricultura Mexicana: Situación y perspectivas. [En línea] disponible en: < <http://www.concitver.com/archivosenpdf/citriculturamexicana.pdf> > [Consulta: 19 Febrero 2015].

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* (Hymenoptera: Eulophidae). Florida Entomologist. 91: 610-620.

Coronado J. M. B., Ruiz, E. C., Nicolaevna, S. M. y Gaona García, G. 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 Graça, J. V., and Korsten, L. 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., Singh, S. P. 1994. Bioefficacy of some Insecticides Against Citrus Psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera:Psyllidae). Crop Res. Hisar, India. 8: 137-140.
- Dalleau-Clouet, C., Gauthier, N., Risterucci, M., Bons, C., and Fargues, J. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. Molecular Ecology Notes. 5: 496-498.
- FAO. 2015. Organización para las naciones unidas para la alimentación y la agricultura, dirección de estadística. [En línea] disponible en: < <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S> > [Consulta: 18 Febrero 2015].
- Faria, M. R., and Wraight, S. P. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A Comprehensive List with Worldwide Coverage and International Clasification of Formulation Types. Biological Control. 31: 237-256.
- 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.
- Fujikama, T., Miyata, S., Iwanami, T. 2013. Convenient Detection of the Citrus Greening (Huanglongbing) Bacterium "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" by Direct PCR form the Midrib Extract. PlosOne. 8(2) : e 57011.doi: 10.1371/ Journal. pone. 005711.

Goettel, M. S., and English, G. 1994. Fungi: Hyphomycetes. Pp. 223-214 In: L. Lacey (Ed.). Manual of techniques in insect pathology. Academic Press. Pag. 409.

Gottwald, T. R., da Graça, J. V., and Bassanezi, R. B. 2007. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. Plant Health Progress. [En línea] disponible en: <
<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/2007/huanglongbing/>>
[Consulta: 17 Febrero 2015].

Gullan, P.J., Cranston, P.S., (2010) The insects. 4 th edition., Wiley-Blackwell, USA. 429-431.

Guzmán-Franco, A. W., Atkins, S. D., Suzanne, J. C., Alderson, P. G., Pell, J. K. 2011. Use of quantitative PCR to understand within-host competition between two entomopathogenic fungi. Journal of Invertebrate Pathology. 107: 155-158.

Guzmán-Franco, A. W., Suzanne, J. C., Alderson, P. G., Pell, J. K. 2009. Competition and co-existence of *Zoophthora radicans* and *Pandora blunckii*, two co-occurring fungal pathogens of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Mycological Research. 113: 1312-1321.

Hajek, A. E., and St. Leger, R. J. 1994. Interactions Between Fungal Pathogens and Insects Hosts. Annal Review of Entomology. 39:293-322.

Halbert, S. E. and Manjunath. 2004. Asian Citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psilidae) and Greening Disease of Citrus a Literature Review and Assesment of Risk in Florida, Florida Entomologist. 90: 327-334.

Hall, G. D., Hentz, M. G. and Ciomperlik, M. A. 2008. Population Ecology and Phenology of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in two Florida Citrus Groves. Environmental Entomology. 37: 914-924.

Hoddle, M.S., Van Driesche, R.G., (2009) Enciclopedia of insects. 2nd edition, editors; H.Resh Vicent, T.Cardé Ring. Academic press, USA. 91-101.

Hoy, M., Raghuwinder, S., amd Rogers, M. 2010. Evaluations of a Novel Isolate of *Isaria fumosorosea* for Control of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). Florida entomologist. 93: 24-32.

Humber, R., Hansen, K., and Wheeler, Isaria plus Paecilomyces, Purpureocillium, and Evlachovaea. ARSEF Catalog. [En línea] disponible en: <<http://www.ars.gov/SP2UserFiles/Place/19070510?ARSEFpdfs/Isaria.pdf>> [Consulta: 21 Febrero 2015].

Inglis, D. G., Jaronsky, S. T., Wraight, S. P. Use of spray oils with entomopathogens. In Spray Oils Beyond 2000: Sustainable Pest and Disease Management; Beattie, G.A.C., Watson, D. M., Eds.; University of Western Sydney: Hawkesbury, Australia, 2002; pp. 302-312.

- INISAV. 1999. La enfermedad del enverdecimiento de los cítricos y su vector (*Diaphorina citri* Kuwayama). Boletín Técnico. La Habana, Cuba. 5 (1).
- Jagoueix, S., Bové J., Garnier, M. 1996. Techniques for the Specific Detection of the Two Huanglongbing (Greening) Liberobacter species: DNA/DNA Hybridisation and DNA Amplification by PCR. En: Proc. Of 13th Conf. of the Intl. Org. of Citrus Virologists (IOCV), da Graça, J. V., Moreno, P., Yokomi, R.K. eds. Riverside, CA: 384-387.
- Kim, J., Je, Y., and Roh, J. 2010. Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidia in corn-corn oil mixture. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology. 37: 419-423.
- Kumar, P., Singh, H. M., and Singh, A. K. 2005. Evaluation of Insecticides and Seed Kernel Extracts Against Citrus Psylla, *Diaphorina citri*. Annal of Plant Protection Science. 13: 478-480.
- Lacey, L. A. and Brooks, W. M. 1997. Initial handling and diagnosis of diseased insects. In L. A. Lacey (Ed.). Manual of Techniques in Insect Pathology. San Diego. Academic Press. Pp. 1-15.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., Vail, P. 2001. Insects Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?. Biological Control. 21: 230-248.
- Lafèche D., Bové J. M. 1970. Structures de Type 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 for 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.

Luangsa-Ard, J., Berkaew, P., Ridkaew, R., Hywel-Jones, N., and Isaka, M. 2009. A beauvericin hot spot in the genus *Isaria*. Mycological Research. 113: 1389-1395.

Luangsa-Ard, J., Hywel-Jones, N., Manoch, L., and Samson, R. 2005. On the relationships of *Paecilomyces* sect *Isarioidea* species. Mycological Research. 109: 58-589.

Mahmoud, M. F. 2009. Pathogenicity of three commercial products of entomopathogenic fungi , *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Lecanicillium lecanii* against adults of olive fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) in the laboratory. Plant Protection Science. 45: 98-102.

Martínez-Carrillo, J. L., y Cortéz-Mondaca. 2008. El Psílido Asiático de los Cítricos *Diaphorina citri* amenaza la producción citrícola de México. Memoria del XI Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas. [Disponible en línea en] <UABC.HTTP://JLMC-ENTOMOLOGO.BLOGSPOT.COM/2010/04/DIAPHORINA-CITRIKUWAYAMA.HTML> [Consulta: 11 Noviembre 2014].

Martínez-Carrillo, J. L. 2009. Ficha Técnica *Diaphorina citri* Kuwayama, Psílido Asiático de los Cítricos. SAGARPA-SENASICA. [En línea] disponible en: <

www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?...21365 > [Consulta: 22 Octubre 2014].

Mead, F. W. 1998. Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Insecta: Homóptera: Psyllidae). University of Florida. IFAS Extensión. [En línea] disponible en: <<http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures/citrus/acpsyllid.htm> > [Consulta: 23 Febrero 2015].

Meyer, J. M., Hoy, M. A., and Boucias, D. G. 2008. Isolation and Characterization of an *Isaria fumosorosea* Isolate Infecting the Asian Citrus Psyllid in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology*. 99: 96-102.

Michaud, J. P. 2001. Numerical Response of *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae) to Infestations of Asian Citrus Psyllid, (Hemiptera: Psyllidae) in Florida. *Florida Entomologist*. 84: 608-614.

Miranda-Salcedo, M. A., López-Arroyo, J. I. 2009. Ecología del Psílido asiático de los Cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae) en Michoacán p. 55. En: *Memorias del XXXII Congreso Nacional de Control Biológico*, Villahermosa, Tab., Méx.

Morales-Reyes, C., Sánchez-Pedraza, F., Rodríguez-Contreras, J. A., Sánchez-Peña, S. R. 2014. 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: 14 Febrero 2015].

Moran, P. J., Patt, J. M., Cabanillas, J.L., Adamczyk, J. L., Jackson, M.A., Dunlap, C. A., Hunter, W. B., Avery, P. B. 2011. Localized autoinoculation and dissemination of *Isaria fumosorosea* for control of the asian citrus psyllid in south Texas. *Subtropical plant science*. 63: 23-25.

NCBI. 2014a. National Center of Biotechnology Information. Taxonomy Browser, *Diaphorina citri*. [En línea] disponible en: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=121845>> [Consulta: 16 Noviembre 2014].

NCBI. 2014b. National Center of Biotechnology Information. Taxonomy Browser. *Isaria fumosorosea*. [En línea] disponible en: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=114497&lvl=3&p=mapview&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&lin=f&keep=1&srch_mode=1&unlock> [Consulta: 21 Febrero 2015].

Nuñez del Prado, E., Iannaccone, J., Gómez, H. 2008. Effect of two entomopathogenic fungi controlling *Aleurodicus cocois* (Curtis, 1846) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Chilean Journal of Agricultural Research*. 68: 21-30.

Onuki, M., Ngoc N., Nesumi, H., Thu, L., Kobayashi, 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.

Pluke, W. R., Escribano, A., Michaud, J.P., Stansly, A. P. 2005. Potential Impact of Lady Beetles on *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Puerto Rico. Florida Entomologist. 88: 123-128.

Rivero-Aragon, A., and Grillo-Ravelo, H. 2000. Natural Enemies of *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) in the Central Region of Cuba. Centro Agrícola, 27: 87-88.

Rogers, M. E., Dewdney, M. M., Futch, S. H. 2011. 2011 Florida Citrus Pest Management Guide: Pesticides Registered for Use on Florida Citrus, University of Florida/ IFAS EDIS document ENY-601, 34 pp. [En línea] disponible en: < <http://edis.ifas.ufl.edu/cg017>> [Consulta: 10 Febrero 2015].

Ruíz, C. E., Coronado, J. M. B., Myartseva, S. N. 2004 The Asian Citrus Psyllid in México. Annual Meeting of the Entomological Society of America. Salt Lake City, UT.

Sánchez-Peña, S. R., Lara, J. S.J., Medina, R. F. 2011. Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, Mexico, and their virulence towards thrips and whiteflies. Journal of Insect Science 11:1-10.

Schneider, H. 1968. Anatomy of Greening-Diseased Sweet Orange Shoots. Phytopathol. 58: 1155-1160.

- SENASICA. 2010. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2010. Notificación de la detección de huanglongbing en el Municipio de Tizimín, Yucatán, Méx. [En línea] disponible en: < <http://www.senasica.gob.mx/default.asp?doc=9361> > [Consulta: 19 Febrero 2015].
- SIAP. 2015. Sistema de información agroalimentaria y pesquera. Cierre de la producción agrícola por cultivo. [En línea] disponible en: < <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> > [Consulta: 18 Febrero 2015].
- Srinivasan, R. M. A., Hoy, M., Singh, R., Rogers, M. E. 2008. Laboratory and Field Evaluations of Silwet L-77 and Kinetic Alone and in Combination with Imidacloprid and Abamectin for the Management of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Florida Entomologist. 91: 87-100.
- Stauderman, K., Avery, P., Aristizabal, L., Arthurs, S. 2012. Evaluation of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) for control of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). Biocontrol Science and Technology. 22: 747-761.
- Sung G-H, Hywel-Jones NL, Sung J-M, Luangsa-ard, J., Shreshtha, B., Spatafora, J. W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the Clavicipitaceous fungi. Stud Mycol. 57: 5-59.
- 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 Ryukuyus. 53:19-24.

- Texeira, D. C., Saillard, C., Eveillard, S., Danet, J. L., da Costa, I., Ayres, A. J., Bové, M. 2005. Candidatus Liberibacter Americanus Associated with Citrus Huanglongbing (greening disease) in Sao Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 1857-1862.
- Tiwari, S., Mann, R. S., Rogers, M. E., Stelinski, L. L. 2011. Insecticide Resistance in Field Populations of Asian Citrus Psyllid in Florida. *Pest Management Science*. 67: 1258-1268.
- Trujillo-Arriaga, J. 2010. Situación Actual, Regulación y Manejo del HLB en México. 2° Taller Internacional Sobre el Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos. Mérida, Yucatán. México. DGSV-SENASICA-SAGARPA. [En línea] disponible en: < <http://calcitrusquality.org/wp-content/uploads/2009/05/MEMORIA-DE-TALLER-DE-MERIDA.pdf> > [Consulta: 10 Diciembre 2014].
- Tsai, J. H., and Liu, Y. H. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) On Four Host Plants. *Journal of Economic Entomology*. 93: 1721-1725.
- 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 Estatus Report for China. *International Journal of Pest Management*. 52: 343-352.
- Zar, J. H. 2010. *Bioestatistical Analysis*. Pearson-Prentice Hall (5Ed). New Jersey, USA. pp. 199-204.

Zimmerman, G. 2008. The Entomopathogenic Fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinose*) and the *Isaria fumosorosea* Species Complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): Biology, Ecology, and Use in Biological Control. *Biocontrol Science and Technology* 18: 865-901.