

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Extractos Nutritivos en la Producción de Hongos Entomopatógenos de
Diaphorina citri, y Aplicación de *Metarhizium brunneum* contra Psílicos Plaga

Por:

MOISÉS FELIPE VICTORIANO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila; México.

Junio de 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Extractos Nutritivos en la Producción de Hongos Entomopatógenos de
Diaphorina citri, y Aplicación de *Metarhizium brunneum* contra Psílicos Plaga

Por:

MOISÉS FELIPE VICTORIANO

TESIS:

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobada



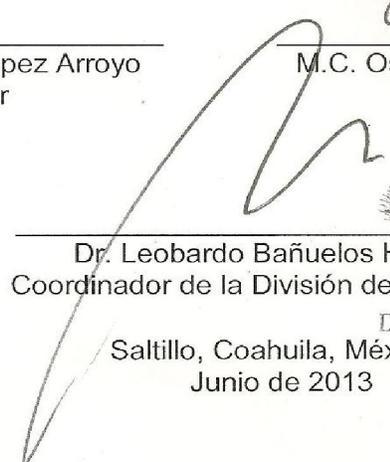
Dr. Sergio René Sánchez Peña
Asesor Principal



Dr. José Isabel López Arroyo
Coasesor

OSCAR E. ROSALEI

M.C. Oscar Eduardo Rosales Escobar
Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinador de la División de Agronomía
Coordinación
División de Agronomía
Saltillo, Coahuila, México.
Junio de 2013

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Marcos Felipe Marín

Por su ejemplo de trabajo, entrega y espíritu de superación, además de apoyo incondicional a lo largo de toda mi formación profesional.

María Guadalupe Victoriano Álvarez

Quien también dedicó tiempo y esfuerzo, además de su apoyo moral y comprensión en los momentos difíciles de mi formación profesional y de la vida.

A MIS HERMANOS:

A todos mis hermanos por brindarme el apoyo necesario para lograr mis metas, en especial a mi hermana Rosa quien siempre me dio esperanzas y estuvo conmigo en cada momento.

CON CARIÑO ESPECIAL PARA:

Para todos mis compañeros y amigos de la UAAAN, por su apoyo y amistad, mis maestros quienes con su esfuerzo constante hicieron realidad terminar mi licenciatura.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por haberme permitido llegar a este nivel.

A MI ALMA MATER

Por darme la oportunidad de terminar mi carrera profesional, de quien siempre estaré orgulloso y agradecido por haberme dado las herramientas necesarias para enfrentar los retos en mi vida.

Al Dr. Sergio René Sánchez Peña, por haberme permitido trabajar en el proyecto de tesis para culminar mi formación académica.

Al MC. Oscar Eduardo Rosales Escobar, por su colaboración para el buen término de este trabajo.

Al Dr. José Isabel López Arroyo por su colaboración en este trabajo y por ser parte del jurado calificador.

A mis amigos y compañeros por compartir momentos de alegría y haber compartido esfuerzos para los metas en común, a todos ellos gracias; de igual forma a mis maestros quienes pusieron lo mejor de ellos para concluir con mis estudios.

CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
CONTENIDO.....	v
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. REVISION DE LITERATURA.....	12
2.1 Generalidades de <i>Diaphorina citri</i>	12
2.2 Biología y características morfológicas.....	12
2.3 Características morfológicas.....	13
2.4 Síntomas de daño ocasionados por <i>Diaphorina citri</i>	14
2.5 Enfermedad Huanglongbing HLB.....	14
2.6 Distribución de <i>Diaphorina citri</i> en el mundo.....	15
2.7 La distribución de <i>Diaphorina citri</i> en México.....	15
2.8 Importancia económica.....	15
2.9 Tipos de control.....	16
2.9.1 Control químico.....	16
2.9.2 Control biológico de <i>Diaphorina citri</i>	17
2.10 Modo de acción de hongos entomopatógenos.....	18
2.11 <i>Metarhizium brunneum</i>	19
2.12 <i>Beauveria bassiana</i>	20
2.13 <i>Nomurea rileyi</i>	22
2.14 <i>Isaria fumosorosea</i>	23
3. OBJETIVOS.....	25
4. HIPÓTESIS.....	25
5. METODOLOGÍA.....	26

5.1 Determinación de un medio de cultivo que incremente la esporulación de cuatro hongos entomopatógenos para el control biológico de <i>Diaphorina citri</i> . (Hemiptera: Psyllidae) en cítricos.....	26
5.1.1 Preparación de medio de cultivo PDA.....	26
5.1.2 Descripción de la preparación de medio PDA.....	26
5.1.3 Siembra de hongos entomopatógenos en cajas Petri.....	27
5.1.4 Preparación de medio sólido (arroz) para inocular hongos entomopatógenos en botellas	27
5.1.5 Inoculación de hongos entomopatógenos en botellas.....	28
5.2 Conteo de conidias.....	28
5.2.1 Preparación de suspensión de esporas.....	28
5.2.2 Conteo de conidias en cámara neubauer.....	29
5.3 Aplicación de <i>Metarhizium brunneum</i> contra psílidos, para determinar porcentajes de ninfas infectadas que caen al suelo después de la aplicación.....	30
5.3.1 Aplicación de <i>Metarhizium brunneum</i> en invernadero contra <i>Bactericera cockerelli</i> en Chile.....	30
5.3.2 Aplicación de <i>Metarhizium brunneum</i> contra <i>Diaphorina citri</i> en brotes de limón.....	31
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6.1 Determinación de un medio de cultivo que incremente la esporulación de cuatro hongos entomopatógenos para el control biológico de <i>Diaphorina citri</i> . (Hemiptera: Psyllidae) en cítricos.....	33
6.2 Aplicación de <i>Metarhizium brunneum</i> contra psílidos, para determinar porcentajes de ninfas infectadas que caen al suelo después de la aplicación.....	38
6.2.1 Aplicación de <i>Metarhizium brunneum</i> en invernadero contra <i>Bactericera cockerelli</i> en Chile.....	38

6.2.2 Aplicación de <i>Metarhizium brunneum</i> contra <i>Diaphorina citri</i> en brotes de limón.....	40
7. CONCLUSIÓN.....	42
8 LITERATURA CITADA.....	43

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla No 1: tratamientos y repeticiones con número de botellas utilizadas en la producción de conidios de 4 hongos entomopatógenos.....	28
Tabla No 2. ANVA de un diseño bifactorial donde el factor A es son cuatro caldos como fuente de nutrientes y el factor B cuatro hongos entomopatógenos de datos obtenidos del conteo de conidias en cámara neubauer.....	34
Tabla No 3: Conidias obtenidas gr ⁻¹ arroz húmedo y Conidias obtenidas gr ⁻¹ arroz seco, en la prueba de diferentes caldos como fuentes de nutrientes para incrementar la esporulación de 4 hongos entomopatógenos.....	37
Tabla No 4: porcentaje de infección de ninfas de <i>Bactericera cockerelli</i> colectadas de plásticos colocados bajo plantas de chile de una aplicación de <i>Metarhizium brunneum</i> a diferente volumen, para determinar si las ninfas una vez infectadas con <i>Metarhizium brunneum</i> caen al suelo.....	39
Tabla No 5: Análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias del peso de salerillo después de la aplicación <i>Metarhizium brunneum</i> a diferente volumen.....	40
Tabla No 6: Resultados de aplicación de <i>Metarhizium brunneum</i> contra <i>Diaphorina citri</i> en limón, para determinar porcentaje de ninfas infectadas que caen al suelo después de la aplicación.....	41
Figura No 1. Conidias/gr de arroz húmedo de 4 hongos entomopatógenos enriquecido con caldos de Maíz, Frijol, Soya y agua destilada (testigo), como fuente de nutrientes.....	38

RESUMEN

Se evaluaron extractos nutritivos en medio sólido para crecimiento y producción de conidias de *Beauveria*, *Nomurea*, *Metarhizium* e *Isaria*, y la aplicación de *Metarhizium brunneum* a psílicos (Ultra Bajo Volumen contra *Bactericera cockerelli*, y aplicación Alto Volumen contra *Diaphorina citri*) para determinar porcentaje de ninfas infectadas que caen al suelo después de la aplicación. El trabajo se realizó en el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Buenavista, Saltillo; Coahuila, y en el campo experimental INIFAP en Ixtacuaco, Tlapacoyan, Veracruz. Se empleó un diseño bifactorial completamente al azar. La comparación de medias fue con Tukey, se evaluó producción de conidias por gr-1 de arroz seco y húmedo, y porcentajes de ninfas infectadas que caen al suelo después de la aplicación de *M. brunneum*. El ANOVA mostro diferencias altamente significativas entre los tratamientos; *B. bassiana* produce 3.8×10^8 conidias por gr-1 de arroz seco al adicionar caldo de maíz, *N. rileyi* produce 5.1×10^8 conidias gr-1 de arroz seco en arroz sin caldo, *M. brunneum* produce 8.6×10^8 conidias por gr-1 de arroz al enriquecer el medio con caldo de soya. Para la variable ninfas de psílicos infectadas por *M. brunneum*, en la aplicación realizada a Ultra Bajo Volumen contra *B. cockerelli* el mejor resultado se obtuvo a un volumen de 0.42 l/min al obtener 12.5 % de ninfas infectadas, en la aplicación convencional a brotes de limón para *D. citri* se obtiene infección de 100 % a las 48 y 72 horas en la primera aplicación, mientras que en la segunda aplicación se obtienen porcentajes de 35 a 42 % a las 48 y 72 horas respectivamente. Con los resultados obtenidos permiten concluir que el caldo de maíz en sustrato solido se puede obtener una buena producción de conidias para *B. bassiana*, mientras que para *M. brunneum* y *Nomurea rileyi* se debe utilizar caldo de soya y solo el sustrato respectivamente. En el caso de ninfas infectadas por *Metarhizium brunneum* se recomienda utilizar el volumen más alto de ULV, 0.42 l/min para el caso de bomba de motor, o volumen convencional (1 l/árbol).

Palabras clave: Hongos entomopatógenos, *Diaphorina citri*, *Metarhizium brunneum*, medio sólido, ninfas, caldo, conidias.

I. INTRODUCCIÓN

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

Los cítricos igual que otros cultivos tienen una población de microorganismos que se asocian produciendo diversas enfermedades. Los virus, viroides, bacterias y hongos son los principales agentes causales de enfermedades, que tienen gran importancia en la citricultura. También son afectados por insectos especialmente picadores chupadores como escamas, áfidos, psílidos, cochinillas y moscas blancas (Baraona y Barrantes 1992). Los psílidos son insectos parecidos a un áfidos que se alimentan de la sabia de árboles de cítricos los 2 principales son *Trioza erytreae* y *Diaphorina citri*.

El psílido asiático de los cítricos fue reportado en el año 2002 en los estados de Campeche y Quintana Roo desde donde se distribuyó a la mayoría de las áreas cítricas del país, provocando cuantiosos daños a árboles de cítricos, debido a que ninfas y adultos extraen savia durante su alimentación, lo que ocasiona una distorsión de hojas, debilita la planta, propicia la formación de fumagina en hojas, además de ser un eficiente vector de la enfermedad denominada Huanglongbing (HLB) conocida como la más destructiva para los cítricos, al reducir la producción

sustancialmente y causar la muerte de la plantación en un periodo de 5 años (Alemán et al. 2007). En México en el año 2009 el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentario de México a través de la Dirección General de Sanidad Vegetal diagnosticó 6 muestras positivas de la enfermedad (Mondaca et al. 2010). El HLB (yellow dragón), citrus greening o enverdecimiento de los cítricos es una enfermedad causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter* sp. una bacteria limitada al floema transmitida por el psílido; es una especie de difícil control que afecta plantas jóvenes y adultos incluyendo híbridos; se considera como la más destructiva del mundo por la severidad de los síntomas, la rapidez con que se dispersa y por ser una enfermedad que aún no tiene cura (Ramos 2008). El impacto económico generado por la presencia del HLB en países productores de cítricos se ha incrementado año con año debido a pérdidas por disminución en rendimiento, así como acciones de control aplicadas al psílido y al HLB; se estima que los costos de producción son aproximadamente de un 30 a 40 % más altos en los últimos años (Sosa et al. 2011).

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

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de *Diaphorina citri*

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

Clasificación taxonómica

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Suborden: Sternorrhyncha

Súper familia: Psylloidea

Familia: Liviidae

Género: *Diaphorina*

Especie: *D. citri* Kuwayama

Nombres comunes: Psílido asiático, Psílido asiático de los cítricos.

2.2 Biología y características morfológicas

La duración del ciclo biológico varía de 14.1 a 49.3 días, a 28°C y 15°C respectivamente, siendo las temperaturas de 25 a 28°C las adecuadas para su desarrollo, mientras que se ha observado que no se desarrollan a temperaturas de 33°C y 10°C. El psílido presenta una longevidad de 3 a 4 meses, dependiendo de las condiciones climáticas, la duración del período embrionario varía de 9.7 días a 15 °C y 3.5 días a 28 °C. Las hembras ovopositan sobre brotes

tiernos y hojas tiernas, cada hembra alcanza a poner 800 huevos en su vida de donde nacen ninfas que se establecen sobre brotes tiernos y pecíolos, formando colonias con un número variable de individuos, presentando un pico poblacional al final de la primavera y a inicios del verano durante el período de brotación de los cítricos.

2.3 Características morfológicas

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

Las ninfas son aplanadas dorsoventralmente de color anaranjado-amarillo, con esbozos alares abultados conspicuos, un par de ojos rojos compuestos y dos antenas de color negro; presentan filamentos a lo largo del abdomen, hilos cerosos cortos que pueden estar presentes sólo en el ápice del abdomen. Tienen 5 estadios ninfales, el 1^{er} estadio miden 0.30 mm. de longitud y 0.17 mm. de ancho; el 2^{do} estadio miden 0.45 mm. de ancho y 0.25 de ancho; el 3^{er} estadio miden 0.74 mm. de longitud y 0.43 de ancho; el 4^{to} estadio miden 1.01 mm. de longitud y 0.70 mm. de ancho; en el 5^{to} estadio miden 1.60 mm. de longitud y 1.02 mm. de ancho, las ninfas de este estadio dan lugar al nacimiento de los adultos. (Tsai y Ying 2000).

El adulto presenta un cuerpo de color café moteado, recubierto de polvo ceroso, ojos rojos, cabeza marrón claro, el primer par de alas más ancho en el extremo con áreas color oscuro. Las antenas presentan el ápice negro con dos manchas marrón claro en la parte media. Los machos son más pequeños que las hembras con la punta del abdomen redondeada, mientras que el abdomen de la hembra termina en una punta bien marcada. Los adultos pueden medir entre 3-4 mm.,, el tamaño promedio de las hembras es 3.3 mm. de largo y 1 mm. de ancho,

mientras que el de los machos es 2.7 mm. de largo y 0.8 mm. de ancho, generalmente se encuentran en posición inclinada con la parte posterior del cuerpo hacia arriba, los adultos tienen poca capacidad para sostener vuelos largos, pero pueden ser transportados a grandes distancias por corrientes de aire (Wenninger y Hall 2008).

2.4 Síntomas de daño ocasionados por *Diaphorina citri*.

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

2.5 Enfermedad Huanglongbing HLB

El primer reporte del HLB se dio en la India en el siglo XVIII, en el sureste de China fue reportado por citricultores a finales del siglo XIX y en África del Sur fue reportada por primera vez en los años veinte, la existencia de la enfermedad en Asia y África propició que a través de los años se dispersara hacia varios países de ambos continentes hasta su llegada a América (Ramos 2008). Esta enfermedad representa una amenaza para la industria mundial de los cítricos, que poco a poco va invadiendo nuevas áreas. El significado del HLB en chino es "dragón amarillo", conocido como verde en el sur de África, hoja moteada en Filipinas, muerte regresiva en la India y degeneración del floema en Indonesia. La bacteria que la origina pertenece al género *Candidatus*, en la actualidad existen 3 especies: *Candidatus liberibacter asiaticus*, *Candidatus liberibacter africanus* y *Candidatus liberibacter americanus*, se cree que cada especie ha evolucionado en el continente por lo que se les dan esos nombres. Los síntomas de la enfermedad son las mismas siempre que se produce, los árboles infectados

muestran una condición de moteado en hojas, brotes amarillos, los cuales son síntomas tempranos de la enfermedad, otros síntomas son arboles raquíticos, frutos pequeños y deformados. Las formas de transmisión son por injerto y mediante vectores como los psílidos *Trioza erytreae* y *Diaphorina citri* que son los 2 principales vectores naturales. En la actualidad existen dos tipos de HLB, la forma Africana sensible al calor transmitida por *T. erytreae* que se desarrolla a temperaturas de 22-25°C, y la forma asiática tolerante al calor, transmitida por *D. citri*, que se sitúa muy por encima de temperaturas 30°C (Meyer y Hoy 2007).

2.6 Distribución de *Diaphorina citri* en el mundo

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

2.7 La distribución de *Diaphorina citri* en México.

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

2.8 Importancia económica

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

que se les atribuye ser transmisores del agente causal del Huanglongbing causado por la bacteria *Candidatus liberibacter* que una vez infectadas las plantas no llegan a vivir más de 5 a 8 años (García 2012).

2.9 Tipos de Control

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

2.9.1 Control químico de *Diaphorina citri*

El control químico del psílido asiático puede realizarse con una gran diversidad de insecticidas existentes en el mercado, los cuales han demostrado proporcionar un control efectivo contra *D. citri*. Se sugiere aplicar los insecticidas a principio del año cuando las condiciones son favorables para el desarrollo de *D. citri*. En huertas sin producción de frutos, se sugiere aplicar productos sistémicos durante los períodos lluviosos, como Imidacloprid o Thiamethoxam, con Imidacloprid ha sido posible el control del 100% de los adultos y 98% de las ninfas, mientras que insecticidas de contacto son utilizados para controlar adultos para reducir la posibilidad de transmisión del HLB. Estos insecticidas tienen un buen efecto para disminuir la densidad de población del insecto (Curtí et al. 2012). Villanueva et al. (2011) mencionan que el empleo de productos insecticidas foliares con el ingrediente activo Monocrotopos, Imidacloprid, Oxamil, Thiamethoxam, Cinnanaldehido y Thiacloprod controla eficientemente las poblaciones de ninfas y adultos del psílido asiático de los cítricos.

2.9.2 Control biológico de *Diaphorina citri*

El control biológico es otra alternativa con que se cuenta para combatir el psílido asiático de los cítricos. Su manejo se basa mediante el uso de enemigos naturales como parasitoides, depredadores y hongos entomopatógenos. Se han introducido parasitoides como *Tamarixia radiata* y *Diaphorencyrtus aligarhensis*, depredadores como *Chilocorus cacti*, *Olla v-nigrum*, *Harmonia axiridis* y hongos entomopatógeno como *Hirsutella citriformis*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium brunneum* e *Isaria fumosorosea* de los cuales se han obtenido buenos resultados.

Rodríguez et al. (2012) buscaron establecer un control biológico mediante la aplicación de depredadores, parasitoides y entomopatógenos. En su trabajo se encontraron ocho especies de enemigos naturales de *D. citri* de los cuales *Olla v-nigrum*, *Chilocorus cacti*, *Cycloneda sanguinea*, *Nephus sp.*, *Pentilia sp.* y *Ceraeochrysa sp.* Fuerón depredadores; *Tamarixia radiata* fue el único parasitoide y como entomopatógeno se identificó *Beauveria bassiana*. Por otra parte Mondaca et al. (2010) en Sonora detectaron cuatro especies de depredadores asociados a *Diaphorina citri*, entre las que se encontraron 2 especies de crisopas (*Chrysoperla comache* y *Chrysoperla rufilabris*) y catarinitas (*Cycloneda sanguinea* y *Olla v.nigrum*). Mientras que en condiciones de laboratorio se ha utilizado *Amblyseius swirskii* para control de *Diaphorina citri*, observándose un alto porcentaje de mortandad (Blasco et al. 2012).

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

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

La producción se basa en granos de cereales, de los cuales el más utilizado es el arroz. Los hongos entomopatógenos tienen la ventaja de ser producidos sobre diferentes sustratos sólidos, además de poder producir blastosporas en medios líquidos a diferencia de otros organismos utilizados en el control microbial. Las formas de propagarlos son en medios de cultivos puros, líquidos, semilíquidos y sólidos.

2.10 Modo de acción de hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos causan la muerte del huésped por deficiencia nutricional, invasión, digestión de tejidos o por liberación de toxinas. Las especies entomopatógenas penetran la cutícula del huésped e invaden el intestino, la cavidad bucal y anal, estas infecciones son iniciadas por esporas o conidios, inician su proceso infectivo cuando las conidias retenidas en el integumento inician el proceso de germinación, con el que el hongo comienza a secretar enzimas como las proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas y lipoxigenasas (Hajek y Leger 1994). Estas enzimas degradan la cutícula del insecto y coadyuvan en el proceso de penetración por presión mecánica iniciado por el apresorio. Una vez dentro del insecto se desarrolla como cuerpos hifales que se van diseminando a través del hemocele invadiendo tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias y hemocitos, ocasionando la muerte del insecto después de 3 a 14 días iniciada la infección (Clarkson y Charnley 1996).

Una vez muerto el insecto y agotados los nutrientes, el hongo inicia un crecimiento micelial invadiendo los órganos del hospedero. Finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie, donde en condiciones ambientales apropiadas inician la formación de nuevas conidias (De la Torre et al. 2006; Nicholls 2008). En *B. bassiana*, y *M. brunneum*, este proceso consta de las siguientes etapas. Etapa uno. Adhesión, se inicia con la adherencia de la espора fúngica en la cutícula del insecto. Etapa dos se inicia con la germinación de la espора, esta etapa depende de la disponibilidad de nutrientes para que la germinación de la espора sea exitosa. Etapa tres penetración de la cutícula por el tubo germinal, la invasión de la cutícula está precedida por la formación del apesorio, en la invasión cuticular se involucran actividades enzimáticas y físicas (Samsinakova et al. 1971). Las enzimas degradan la capa externa de la cutícula, liberando pequeños fragmentos peptídicos de aproximadamente cinco aminoácidos de longitud que son utilizados por el hongo como nutrientes. La etapa cuatro consiste en el desarrollo del hongo en el hemocele y los tejidos (Hong 2003; Bustillo y Posada 1986). Una vez que los hongos han alcanzado la hemolinfa de los insectos estos producen enzimas del tipo de las glicosidasas, las cuales les permiten capturar los nutrientes que son propios del insecto, también en esta etapa producen proteínas que actúan como toxinas, en *B. bassiana*, *M. brunneum* se ha reportado la producción de ácido oxálico, ácido 2,6-piridin-dicarboxílico, que poseen propiedades insecticidas contra larvas de *Calliphora erythrocephala*; también se han reportado toxinas peptídicas tóxicas contra larvas de *Choristoneura fumiferana*, la acción de estos compuestos es específica para ciertos grupos de insectos y su acción se debe a la acción sinérgica de un complejo de compuestos (Quintero 1998).

2.11 *Metarhizium brunneum*

M. brunneum es un hongo parásito facultativo, cuya reproducción asexual se realiza a partir de conidios, que al germinar sobre la cutícula del insecto producen toxinas que causan la muerte al ocurrir la invasión de su cuerpo por el hongo. A

partir de 1986 se iniciaron las primeras investigaciones del hongo en pastizales y caña de azúcar para controlar el insecto-plaga conocido como *Aeneolamia* sp., con resultados prometedores a tal punto que en la actualidad, el hongo se produce en forma comercial (Álvarez et al. 1996).

Clasificación taxonómica

Reino: Fungí

División: Eumycota

Subdivisión: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Metarhizium*

Especie: *brunneum*

La colonia de *M. brunneum* es de color verdoso oscuro, el conidióforo crece de un micelio ramificado irregularmente con 2 o 3 ramas en cada septo de 4 a 14 μ de longitud por 1.5 a 2.5 μ de diámetro, presenta fialides cilíndricas, adelgazados; en el ápice mide de 6 a 13 μ de longitud y de 2 a 4 μ de diámetro, las conidias son unicelulares cilíndricas y truncadas, formadas en cadenas largas, hialinas a verde oliváceo; miden de 3.5 a 9 micrómetros de longitud por 1.5 a 3.5 μ de diámetro. Requiere un rango de 24 a 30 °C para su crecimiento y esporulación, puede morir a temperaturas de 49 °C durante 10 minutos, esporula bien sobre insectos a una atmosfera de 40 a 60 % de humedad con un óptimo de 30 °C, las epizootias están correlacionadas con la alta humedad relativa (Bermudez 2006).

2.12 *Beauveria bassiana*

B. bassiana tiene la habilidad de vivir de manera parasítica y saprofita, lo que le permite sobrevivir en presencia o ausencia de insectos huésped. Cuando se

encuentra en materia orgánica, su morfología micelial genera una red amplia filamentosa originada a partir de un conidio; sin embargo, en presencia de un insecto huésped, el conidio germina una vez dentro del insecto forma una red de hifas que una vez colonizada, pasa nuevamente a una formar estructuras similares a la de levadura. La unión de una espóra fúngica a la superficie de la cutícula de un huésped susceptible representa el evento inicial en el establecimiento de micosis. *Beauveria bassiana* al igual que muchos hongos entomopatógenos al germinar la espóra forman una estructura denominada apresorio con la que se inicia la invasión del hospedero (Hong 2003).

Clasificación taxonómica

Reino: Fungí

División: Mycota

Subdivisión: Eumycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Beauveria*

Especie: *bassiana*

La colonia de *B. bassiana* en PDA a los 14 días es algodonosa a polvorienta de color blanco a medida que pasa el tiempo se vuelve amarillenta cremosa, presenta conidióforos de 1 a 2 μm de diámetro donde crecen las células conidiogénas en grupos grandes, estas células están agrupadas formando grupos grandes, en ocasiones las células conidiogénas se ramifican formando células conidiogénas secundarias en la que se forma un raquis que sostiene las conidias. Las conidias son hialinas globosas a subglobosas de 2 a 3 μm que se insertan sucesivamente en el raquis en forma opuesta (Ames 2004).

2.13 *Nomurea rileyi*

El hongo entomopatígeno *Nomurea rileyi* tiene una distribución mundial, es enemigo natural de especies de lepidópteros como *Anticarsia gemmatalis*, *Heliothis zea*, *H. virescens*, *Pseudoplusia includens* y *Trichoplusia ni*. En condiciones de campo se han observado epizootias naturales al suprimir poblaciones de estas plagas, se ha estimado que una introducción temprana de conidias de este hongo en una población baja de lepidópteros puede regular la población de la plaga. La temperatura óptima para el crecimiento micelial y esporulación del hongo es de 25 °C mientras que a temperaturas de 5, 35, 37 y 40 °C y entre 40 y 60 % de humedad no presenta germinación de conidias.

Clasificación taxonómica

Reino: Fungí

División: Mycota

Subdivisión: Eumycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Nomurea*

Especie: *rileyi* (Farlow)

Aunque este hongo es patógeno de lepidópteros, se incluye aquí por su relación con los restantes hongos mencionados. El crecimiento inicial de *Nomurea rileyi* es similar a las levaduras por gemación del tubo germinal de un conidio, los cuales a los pocos días estos cuerpos hifales en forma de levadura producen un color crema. Su esporulación es localizada inicialmente la cual posteriormente se dispersa a través de la colonia, que cambia de un color blanco cremoso a un verde pálido hasta un verde intenso, las hifas vegetativas miden de 2 a 3 µm de diámetro septadas, hialinas a ligeramente pigmentadas. Los conidióforos que

crecen de hifas sumergidas son erectos, septados miden hasta 150 μm en longitud y de 2 a 5 μm de diámetro, las ramas que forman cerca de cada septo se desarrollan en ramilletes cada uno dando origen a 2 o 4 fialides. Las ramas de son por lo general cilíndricas y ocasionalmente con una base hinchada, los conidios son lisos elipsoides de color verde pálidos con dimensiones de 3.4 a 4.5 por 22 a 3. a μm de diámetro (bustillo y posada 1986).

2.14 *Isaria fumosorosea*

Isaria fumosorosea es un organismo capaz de infectar gran variedad de insectos, es muy infectiva contra *Bemisa sp.* en todas sus etapas de desarrollo provoca altos niveles de mortalidad a mayor velocidad que otros hongos entomopatógenos, entre las 24 y 48 horas posteriores a la aplicación de las conidias. *Isaria fumosorosea* se desarrolla como micelio aéreo cuando las condiciones ambientales son favorables; en condiciones como falta de nutrientes o poca agua desencadena la esporulación (Asaff 2006).

Clasificación taxonómica según Ulloa y Herrera (1994)

Reino: Fungí

División: Mycota

Subdivisión: Eumycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Isaria*

Especie: *fumosorosea*

El hongo *Isaria fumosorosea* presenta hifas hialinas a amarillosas, septadas, de paredes delgadas con ramificaciones verticiladas o irregularmente ramificadas en su parte terminal en cada rama un grupo de fialides, las cuales pueden ser

solitarias. Las fialides constan de una porción basal cilíndrica o hinchada, adelgazándose abruptamente a menudo para formar un cuello muy notorio. Los conidióforos llevan cadenas de conidias; hialinas, unicelulares y de forma ovoide de 3.5 μm . Crece con micelio blanco tornándose con el tiempo a color rosado-gris, rosado-oscuro, gris (Chan 2009).

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluación de extractos nutritivos (de maíz, soya, frijol), en un medio sólido para el crecimiento y producción de conidias, de los hongos entomopatógenos *Beauveria*, *Nomurea*, *Metarhizium* e *Isaria* y evaluar la aplicación de *Metarhizium brunneum* contra psílicos para determinar porcentaje de ninfas infectadas que caen al suelo después de la aplicación.

Objetivos específicos:

- 1.- Identificar un medio solido que incremente la esporulación de los hongos entomopatógenos *Nomurea rileyi*, *Metarhizium brunneum*, *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea*
- 2- Evaluación del efecto de *Metarhizium brunneum* en campo, sobre ninfas de *Diaphorina citri*, sobre plantas de limón persa, en campo experimental INIFAP Ixtacuaco, Tlapacoyan, Veracruz.
- 3.- Evaluación el efecto de *Metarhizium brunneum* en invernadero, sobre ninfas de *Bactericera cockerelli*, sobre plantas de chile habanero, en Saltillo, Coahuila.

IV. HIPÓTESIS

Cuando menos, uno de los medios solidos enriquecidos con los caldos como fuente de nutrientes incrementara la esporulación de los hongos entomopatógenos comparado con el testigo.

Cuando menos un volumen de aplicación de *Metarhizium brunneum* incrementara el número de ninfas de psílicos infectados por el hongo que caerán al suelo después de una aplicación.

V. METODOLOGÍA

5.1 Determinación de un medio de cultivo que incremente la esporulación de cuatro hongos entomopatógenos, enemigos naturales de insectos incluyendo *Diaphorina citri*. (Hemiptera: Psyllidae).

El experimento se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de Posgrado y en Cámara Bioclimática del Departamento de Parasitología Agrícola perteneciente a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro ubicado en Buenavista, Saltillo, Coahuila; México. En los meses de septiembre del 2012 a abril del 2013.

5.1.1 Preparación de medio de cultivo PDA

Se preparó medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA), con extracto de levadura y extracto de malta para la propagación de cuatro hongos entomopatógenos con la finalidad de utilizarlos como inóculo en sustrato arroz.

5.1.2 Descripción de la preparación de medio PDA

1. Se pesaron 16 gramos de PDA, 5 gramos de extracto de malta, 5 gramos de extracto de levadura en una balanza analítica.
2. Se colocaron los reactivos en un matraz Erlenmeyer, donde se le agregó medio litro de agua destilada y para homogenizar la mezcla se calentó durante 10 minutos sin hervir agitando constantemente.
3. Se esterilizó el medio de cultivo en una olla de presión a 120 °C durante 15 minutos.
4. Se dejó enfriar el medio, posteriormente se vació en 40 cajas Petri en una cámara de flujo laminar, donde se dejaron enfriar por 24 horas para la inoculación de los hongos entomopatógenos.

5.1.3 Siembra de hongos entomopatógenos en cajas Petri

Se sembraron en las 40 cajas Petri los hongos entomopatógenos *Nombre rileyi*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium brunneum* e *Isaria fumosorosea*. (10 cajas Petri por cada hongo). Las cepas utilizadas en este trabajo fueron previamente seleccionados y evaluados respecto a virulencia y patogenicidad en trabajos anteriores por Vega et al., (2010) y Sánchez-Peña et al., (2011). En la cámara de flujo laminar se esterilizo el asa bacteriana sumergiéndolo en alcohol al 96 % y colocándolo al fuego, Se dejó enfriar y se tomaron conidias de las cepas puras, las cuales se sembraron en forma de estría en las cajas Petri, se sellaron y fueron colocados en un estante a 22.5 °C hasta que esporularon completamente.

5.1.4 Preparación de medio sólido (arroz) para inocular hongos entomopatógenos en botellas

Descripción del procedimiento.

1. Se calentaron 5 litros de agua destilada a 85 °C y fue colocada en un recipiente plástico donde se le agregaron 3 kg de arroz, 6 gotas de hipoclorito de sodio (NaClO) cloralex al 10 % y 3 ml de Gentamicina al 0.01 %.
2. Se mezcló el cloro, la gentamicina en el agua con el arroz y se dejó reposar por 25 minutos.
3. Se limpió el arroz drenando toda el agua posible.
4. Se pesaron 20 gramos de arroz húmedo en una balanza el cual fue colocado en botellas de 210 mililitros.
5. A cada botella con el arroz se le agrego 10 ml del caldo correspondiente para cada tratamiento (soya, maíz, frijol y agua destilada-testigo).
6. Se esterilizaron las botellas en 2 ollas de presión a 120 °C durante 15 minutos, se dejaron enfriar por 24 horas para su posterior inoculación.

5.1.5 Inoculación de hongos entomopatógenos en botellas

Para la inoculación de los hongos entomopatógenos se limpió el área de trabajo y se encendieron 2 mecheros para evitar contaminación, con el asa bacteriana se dio un raspado a la colonia del hongo esporulado para sacar la mayor cantidad de conidias. Estas conidias se sacudieron en las botella con el sustrato de tal forma que cayeran lo más uniforme posible, cada botella se le colocó una torunda y fue sellada con cinta parafilm para evitar contaminación y pérdida de agua. Una vez terminado la siembra de los hongos las botellas se colocaron en un estante a 22.5 °C donde se hicieron observaciones 3, 5, 9 y 12 días después de la inoculación para observar el crecimiento de los hongos entomopatógenos.

Tabla No 1: tratamientos y repeticiones con número de botellas utilizadas en la producción de conidios de 4 hongos entomopatógenos

Hongo entomopatógeno	CALDOS UTILIZADOS			
	Testigo	Maíz	Soya	Frijol
<i>Beauveria bassiana</i>	10	10	9	9
<i>Nomurea rileyi</i>	10	10	9	9
<i>Metarhizium brunneum</i>	10	10	9	9
<i>Isaria fumosorosea</i>	10	10	9	9

5.2 Conteo de conidias

El conteo de conidias se llevó a cabo para determinar, el número de conidias producidas por gramo de arroz húmedo y seco por parte de los hongos entomopatógenos evaluados. El conteo se realizó 12 días después de la inoculación, cuando se observó una esporulación completa en el sustrato (arroz).

5.2.1 Preparación de suspensión de esporas

Descripción de preparación de suspensión de conidias.

1. Se prepararon 10 litros de agua corriente con Bionex (coadyuvante

agrícola) al 0.03 %

2. Se le agrego 50 ml de la solución de Bionex a 9 botellas del mismo tratamiento
3. Se agito cada botella durante 1 minuto hasta obtener la suspensión de conidias
4. La suspensión de conidias obtenida se colocó en un frasco de precipitados de 1000 ml.
5. En la libreta de notas se anotó la suspensión total de conidias obtenida.
6. De la suspensión total se extrajeron 50 ml al cual se le añadieron 100 ml de alcohol etílico para que las esporas no germinaran y se pudiera hacer el conteo después.
7. La dilución obtenida se colocó en una botella de 210 ml el cual se tapó y se etiqueto con el tratamiento correspondiente y la dilución realizada
8. el mismo procedimiento se realizó para cada uno de los tratamientos en el experimento.

5.2.2 Conteo de conidias en cámara neubauer

El conteo de conidias se llevó a cabo con la ayuda de una cámara neubauer en un microscopio óptico a 40x. El número de conidias obtenidas en un cuadrante de la cámara neubauer, se le realizo un ANOVA para poder obtener medias de conidias del conteo a partir del cual se obtuvo el número de conidias por ml, con el número de conidias por ml se pudo sacar las conidias producidas por gramo de arroz húmedo y seco que se muestran en la tabla 3.

En el experimento se evaluaron 3 caldos como fuente de nutrientes, (maíz, soya, frijol y agua destilada-testigo) y 4 hongos entomopatógenos (*Nomurea rileyi*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizum brunneum* e *Isaria fumosorosea*), lo que da un total de 16 tratamientos con 5 repeticiones cada uno. Los datos obtenidos fueron corridos en el paquete estadístico de la Universidad Autónoma de Nuevo León en un diseño bifactorial completamente al azar donde el factor A fueron 3 caldos

como fuente de nutrientes y agua para el testigo, el factor B fueron 4 hongos entomopatógenos. El diseño se realizó con la finalidad de poder observar los efectos de los 2 factores, y poder evaluar la manera en que dichos factores interactúan en la producción de conidias.

5.3 Aplicación de *Metarhizium brunneum* contra psílicos, para determinar porcentajes de ninfas infectadas que caen al suelo después de la aplicación.

5.3.1 Aplicación de *Metarhizium brunneum* en invernadero contra *Bactericera cockerelli* en Chile.

La aplicación de *Metarhizium brunneum* se llevó a cabo en el invernadero del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Contra el psílido de la papa, *Bactericera cockerelli*, debido a la alta disponibilidad de este insecto el cual está muy relacionado con *Diaphorina citri*, Presentando una conducta muy parecida sobre plantas hospederas (solanáceas). En la UAAAN comúnmente hay altas infestaciones de *B. cockerelli*, por lo que se evaluaron las conidias de *Metarhizium brunneum* aplicadas contra este insecto, y producidas en los medios descritos en este trabajo.

Los tratamientos consistieron en la aplicación de conidias con una bomba de motor Stihl. Los testigos consistieron en la aplicación de Bionex al 0.03 %, con boquillas a un volumen de 0.20, 0.42 l/min y un testigo absoluto, los tratamientos de *Metarhizium brunneum* se efectuaron con boquillas a un volumen de 0.10, 0.20 y 0.42 l/min. Se aplicó una concentración de conidias de *Metarhizium brunneum* de 4×10^8 conidias por ml.

Dos días después de la aplicación se le colocaron a cuatro plantas (por tratamiento) seleccionadas al azar, dos bolsas de plástico. Las bolsas plásticas fueron colocados en el tallo de las plantas de Chile de tal forma que cubriera el

diámetro foliar de la planta. Cuatro días después de colocar los plásticos se colectaron diez ninfas de *Bactericera cockerelli* por cada plástico lo que da un total de 40 ninfas por tratamiento, las ninfas fueron colocados en cámara húmeda a 22.5 °C, se realizaron observaciones a los seis y nueve días después de la incubación para observar el porcentaje de infección por *Metarhizium brunneum*. Asimismo la mielecilla que cayó en este tiempo en las bolsas plásticas se pesó para determinar la cantidad de salerillo producido por *Bactericera cockerelli* después de la aplicación del hongo entomopatógeno.

Los datos obtenidos fueron corridos en el paquete estadístico de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en un diseño completamente al azar con 6 tratamientos y 4 repeticiones cada uno para la cantidad de salerillo producida por *Bactericera cockerelli*.

5.3.2 Aplicación de *Metarhizium brunneum* en campo contra *Diaphorina citri* en brotes de limón.

La aplicación de *Metarhizium brunneum* se llevó acabo en Ixtacuaco, municipio de Tlapacoyan Veracruz, contra el psílido *Diaphorina citri*, para determinar el porcentaje de ninfas infectas que caen al suelo después de la aplicación. Se realizaron 2 aplicaciones, en la primera se aplicaron 7.9×10^8 conidias por ml, en la segunda se aplicaron 6.7×10^8 conidias por ml.

Los tratamientos consistieron en la aplicación de Bionex al 0.03 % (testigo) y *Metarhizium brunneum* a 18 brotes de limón con alta infestación del psílido, a cada brote se le coloco una trampa que consistió en un cartón de 20 cm de ancho por 30 de largo dentro de un plástico para capturar las ninfas que caían después de la infección por el hongo, las evaluaciones se realizaron a las 48, 72 y 96 horas después de la aplicación, se colectaron las ninfas encontradas en las trampas, se colocaron en cámara húmeda a 30 °C y se observaron cada 2 días la infección

de las ninfas por *Metarhizium brunneum*, a los 12 días se realizó la última observación de donde se sacó el porcentaje de infección.



Trampa colocada en brote de limón para capturar ninfas, que se caen después de la infección.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Determinación de un medio de cultivo que incremente la esporulación de cuatro hongos entomopatógenos, enemigos naturales de insectos incluyendo *Diaphorina citri*. (Hemiptera: Psyllidae).

La primera observación del crecimiento micelial se llevó a cabo tres días después de la siembra de los hongos entomopatógenos, se observó mayor crecimiento en las botellas inoculadas con *Metarhizum brunneum*, observándose mayor colonización en las botellas que se le adicionó caldo de frijol. Las botellas inoculadas con *Beauveria bassiana* también mostraron un crecimiento acelerado siendo mayor en las botellas donde se le agrego caldo de soya. Mientras que las botellas inoculadas con *Isaria fumosorosea* y *Nomurea rileyi* mostraron poco crecimiento micelial para todos los tratamientos.

A los cinco después de la siembra, las botellas inoculadas con *Metarhizum brunneum* mostraban crecimiento micelial en todas las tratamientos evaluadas, se observó una coloración verdosa en todas las botellas indicando que se iniciaba la esporulación. En las botellas inoculadas con *Beauveria bassiana* se observó crecimiento micelial en todas las botellas. Las inoculadas con *Nomurea rileyi* mostraron poco crecimiento micelial en el sustrato de manera aislada, para *Isaria fumosorosea* se observó crecimiento micelial en las botellas donde se les adiciono caldo de frijol, maíz, y el tratamiento testigo, mientras que donde se adiciono caldo de soya no se observó crecimiento, lo que indica que posiblemente existía algo que inhibía el crecimiento de *Isaria fumosorosea*.

A los nueve días en las botellas inoculadas con *Metarhizum brunneum* y *Beauveria bassiana* se observó esporulación en todo el sustrato, en las botellas inoculadas con *Nomurea rileyi* se observó inicios de esporulación de manera aislada en el sustrato, mientras que para *Isaria fumosorosea* aunque se observaba crecimiento micelial en las botellas de tres tratamientos no se observó la esporulación.

A los doce días después de la inoculación en las botellas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium brunneum* se observaba una esporulación en todo el sustrato, mientras que para el caso de las botellas inoculadas con *Nomurea rileyi* mostraban una colonización en el sustrato de aproximadamente un 80 %. A partir de estas observaciones realizadas se llevó a cabo la extracción y conteo de las conidias.

Tabla No 2. ANVA de un diseño bifactorial donde el factor A es son cuatro caldos como fuente de nutrientes y el factor B cuatro hongos entomopatógenos de datos obtenidos del conteo de conidias en cámara neubauer.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
CALDOS (A)	3	17931.625000	5977.208496	36.2616 **	0.000
HONGOS (B)	3	1039947.750000	346649.250000	2102.9956 **	0.000
INTERACCION	9	125976.625000	13997.402344	84.9172 **	0.000
ERROR	64	10549.500000	164.835938		
TOTAL	79	1194405.500000			

FV= Fuente de variación, GL= Grados de libertad, SC= Suma de cuadrados, CM= Cuadrados medios, F= F Calculada

En la tabla dos se muestra el ANOVA donde se observan diferencias altamente significativas entre los 2 factores y la interacción, factor A (caldos como fuente de nutrientes), factor b (hongos entomopatógenos). Con lo que se puede deducir que en esta interacción los caldos estimulan la producción de conidias de los 4 hongos entomopatógenos.

En la tabla tres se muestra el ANOVA donde se observa diferencias altamente significativas entre los tratamiento, muestran las medias obtenidas del conteo de Conidias gr⁻¹ arroz húmedo y seco para cada caldo. *Beauveria bassiana* presenta una mayor producción de conidias en el tratamiento enriquecido con caldo de maíz siendo superior al testigo en un 44.4 % mas conidias por gr⁻¹ de arroz, mientras que el caldo que indujo la menor producción fue el de soya al obtener una producción de 16.6 % conidias por gr⁻¹ de arroz comparado con el testigo.

Nelson et al. (1996) menciona que la producción de conidias de *Beauveria bassiana* en arroz enriquecido con glucosa y extracto de levadura produce 3.02×10^9 conidias por gr^{-1} de arroz, mientras que *Beauveria brongniartii*. Produce 1.42×10^9 conidias por gr^{-1} de arroz. Robles et al. (1996) al realizar pruebas en restos de cultivo (trigo y avena) para crecimiento y esporulación de *Beauveria bassiana* obtuvo resultados de 6.5 y 5.5×10^7 conidias por gramo en sustrato trigo y avena respectivamente. En nuestros resultados se logró obtener una producción de 10^8 conidias por gr^{-1} de arroz, lo que supera a los resultados obtenidos por Robles en 1996, mientras que los resultados obtenidos por Nelson en 1996 supera nuestra producción, en medio sólido (arroz) enriquecida con glucosa y extracto de levadura, con lo que se puede concluir que una producción de conidias en arroz enriquecida solo con caldo de maíz se puede obtener una buena producción de conidias de *Beauveria bassiana*.

Para *Nomurea rileyi* se puede apreciar que el mejor tratamiento la obtuvo el testigo y al obtener una menor producción de conidias los caldos evaluados. Thakre, et al. 2011, menciona que la producción de conidias de *Nomurea rileyi* en arroz con extracto de levadura al 1% se obtiene 5.53×10^7 conidias por gr^{-1} de arroz. Mientras que en sorgo se obtienen 4.01×10^7 conidias por gramo de sorgo triturado. Méndez et al. (2010) menciona una producción de 8.93×10^9 conidios por gr^{-1} de arroz enriquecido con melaza y extracto de levadura a los 18 días después de la siembra. Con los resultados obtenidos en el trabajo se puede producir 10^8 conidias por gr^{-1} de arroz, en los tratamientos en los que se le adiciono caldo de soya, frijol, como fuente de nutrientes y el tratamiento testigo. Con lo que se superan los resultados obtenidos por Thakre, mientras que Méndez supera la producción obtenida en el trabajo debido su producción en arroz fue enriquecido con melaza y extracto de levadura. Con nuestros resultados se puede concluir que una producción de conidias de *Nomurea rileyi* se puede realizar en arroz sin enriquecer el sustrato con caldos, debido a que se puede obtener una buena producción de conidias.

Para *Metarhizium brunneum*, el tratamiento que presento mayor producción de conidias fue el que se le adiciono caldo de soya al obtener una producción de 45.09 % mas conidias por gr⁻¹ de arroz comparado con el testigo, el tratamiento que menos favoreció la producción de conidias fue el que se le adiciono caldo de frijol al obtener un 15 % mas conidias por gr⁻¹ de arroz respecto al testigo. Sandoval et al. (2011) mencionan que *Metarhizium brunneum* sobre arroz entero con una humedad de 10 ml/50 gr de arroz produce 9.8×10^8 Conidias por gr⁻¹ de arroz, mientras que Bharati, et al (2007), mencionan una producción de 1.0×10^9 conidias por gr⁻¹ de arroz triturado más extracto de levadura al 1%, mientras que con el maíz triturado más extracto de levadura al 1 % obtuvo 8.41×10^8 conidias por gr⁻¹ de arroz. Nelson, et al., 1996. Menciona una producción de 1.42×10^9 conidias por gr⁻¹ de arroz enriquecido con glucosa y extracto de levadura. Barajas et al. (2010) Menciona que *Metarhizium brunneum* en a los 12 días de incubación se obtiene un rendimiento de 10^9 conidias por gramo de arroz adicionado con 15 ml de inóculo producida por fermentación basado en sacarosa y extracto de levadura. En nuestro trabajo se obtuvo una producción de 10^8 conidias por gr⁻¹ de arroz resultados similares a los de Sandoval y Bharati en Maíz con extracto de levadura al 1 %, por otra parte Bharati, Nelson y Barajas obtuvieron una producción de 10^9 al adicionar al arroz glucosa y extracto de levadura. Por lo que en una producción de arroz enriquecida con caldo de soya se puede obtener una buena producción de 10^8 conidias por gr⁻¹ de arroz de *Metarhizium brunneum*, sin enriquecer el sustrato con glucosa, sacarosa y extracto de levadura con lo que se incrementarían los costos de producción.

Nota: el hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea*, no mostro esporulación en los tratamientos, siendo su crecimiento micelial lento en los caldos de Maíz, Frijol y Testigo; mientras que en el caldo de soya no mostro crecimiento micelial, por lo que se deben de buscar nuevas formas que puedan incrementar la esporulación

Tabla No 3: Conidias obtenidas gr⁻¹ arroz húmedo y Conidias obtenidas gr⁻¹ arroz seco, en la prueba de diferentes caldos como fuentes de nutrientes para incrementar la esporulación de 4 hongos entomopatógenos.

Hongo entomopatógeno	Caldo	Conidias gr ⁻¹ arroz húmedo	Conidias gr ⁻¹ arroz seco
<i>Beauveria bassiana</i>	Testigo	1.8 x10 ⁸ B	2.6x10 ⁸ B
	Maíz	2.6 x10 ⁸ A	3.8 x10 ⁸ A
	Soya	2.1 x10 ⁸ A	3.1 x10 ⁸ A
	Frijol	2.2 x10 ⁸ A	3.3 x10 ⁸ A
C.V. %		9.05	9.05
S.E		**	**
<i>Nomurea rileyi</i>	Testigo	3.5 x10 ⁸ A	5.1 x10 ⁸ A
	Maíz	5.7 x10 ⁷ C	7.9 x10 ⁷ C
	Soya	1.6 x10 ⁸ B	2.3 x10 ⁸ B
	Frijol	1.0 x10 ⁸ C	1.5 x10 ⁸ C
C.V. %		9.05	9.05
S.E		**	**
<i>Metarhizium brunneum</i>	Testigo	4.0 x10 ⁸ C	5.9 x10 ⁸ C
	Maíz	5.7 x10 ⁸ A	8.5 x10 ⁸ A
	Soya	5.8 x10 ⁸ B	8.6 x10 ⁸ B
	Frijol	4.6 x10 ⁸ C	6.8 x10 ⁸ C
C.V. %		9.05	9.05
S.E		**	**

En la figura uno se puede apreciar que *Metarhizium brunneum* obtuvo los valores más altos de producción de conidias/gr de arroz húmedo enriquecido con los caldos de maíz, soya, frijol y agua para el testigo como fuente de nutrientes, mientras que *Beauveria bassiana* obtiene un segundo lugar en los medios enriquecidos con caldo de maíz, soya y frijol y obtiene tercer lugar en el tratamiento testigo, para el caso de *Nomurea rileyi* obtiene un segundo lugar en el tratamiento testigo, y tercer lugar en los caldos de maíz, soya y frijol, Mientras que *Isaria fumosorosea* no figura en la producción de conidias en los medios evaluados debido a que no mostro esporulación.

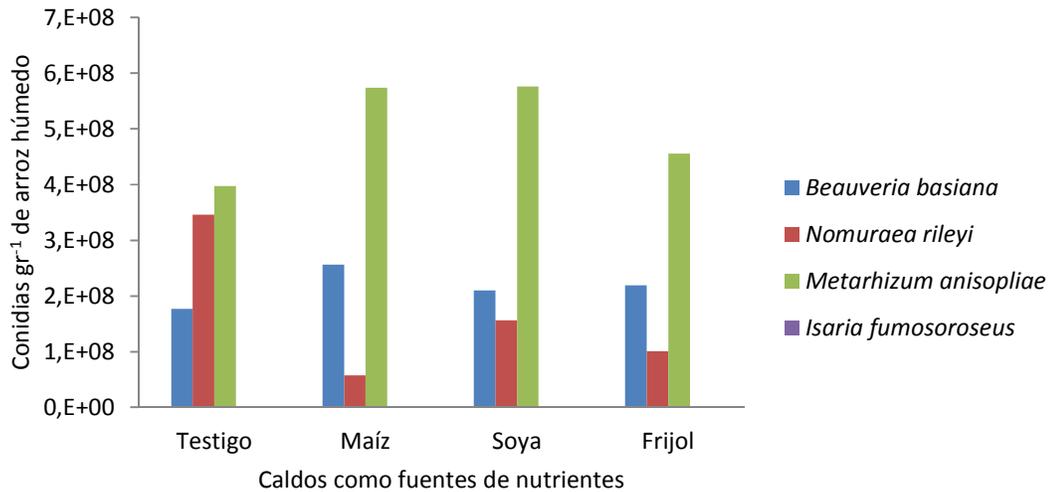


Figura No 1. Conidias/gr de arroz húmedo de 4 hongos entomopatígenos enriquecido con caldos de Maíz, Frijol, Soya y agua destilada (testigo), como fuente de nutrientes.

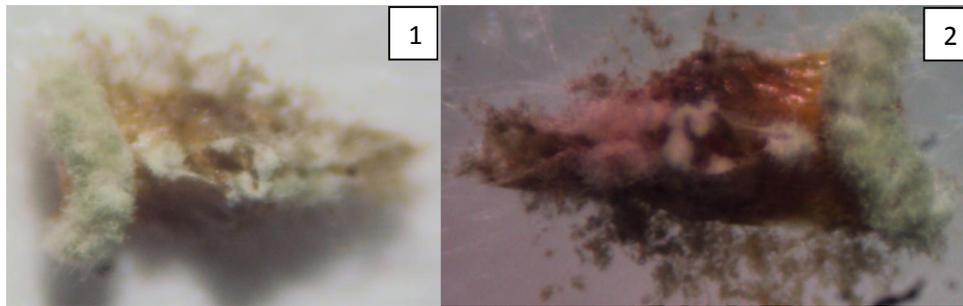
6.2 Aplicación de *Metarhizium brunneum* contra psílicos, para determinar porcentajes de ninfas infectadas que caen al suelo después de la aplicación

6.2.1 Aplicación de *Metarhizium brunneum* en invernadero contra *Bactericera cockerelli* en Chile

A los seis días de incubación se realizó la primera observación para determinar si existía crecimiento de *M. brunneum*, se encontró una ninfa infectada a un volumen de 0.20 l/min., 2 ninfas infectadas a un volumen de 0.10 l/min. y 2 ninfas infectadas de la aplicación a un volumen de 0.42 l/min. A los nueve días de incubación se encontraron 2 ninfas infectadas a un volumen de 0.20, y 3 ninfas infectadas a un volumen de 0.42 l/min.

En el cuadro cuatro se observan porcentajes de ninfas infectadas que caen al suelo de una aplicación de *M. brunneum* a diferente volumen en plantas de Chile en invernadero. A un volumen de 0.10 l/min. el 5 % de las ninfas que caen al suelo presentaron infección de *Metarhizium brunneum*. Mientras que a un volumen de 0.20 l/min. el 7.5 % de las ninfas colectadas presentaron infección

por el hongo entomopatógeno; a un volumen de 0.42 l/min. el 12.5 % de las ninfas mostraron infección por el hongo. Con los datos obtenidos se concluye que cierto porcentaje de ninfas muertas por el hongo entomopatógeno se desprenden de las plantas de Chile, incrementándose los porcentajes de infección aun volumen mayor. Casique-Valdés (2010) reporta porcentajes de infección de 40-60% al aplicar la misma cepa de *M. brunneum* contra *D. citri*.



1: Ninfa infectada con *Metarhizium brunneum* 6 días después de la infección; 2: ninfa infectada 9 días después de la aplicación

Tabla No 4: porcentaje de infección de ninfas de *Bactericera cockerelli* colectadas de plásticos colocados bajo plantas de Chile de una aplicación de *Metarhizium brunneum* a diferente volumen, para determinar si las ninfas una vez infectadas con *Metarhizium brunneum* caen al suelo.

Volumen de aplicación	Observaciones		Total	% de infección
	29-02-13	01/02/2013		
M.a. 0.10 l/min	2	0	2	5%
M.a. 0.20 l/min	1	2	3	7.5%
M.a. 0.42 l/min	2	3	5	12.5%
Bionex 0.8 l/min	0	0	0	0%
Bionex 2.0 l/min	0	0	0	0%
Testigo absoluto	0	0	0	0%

M.a.: *Metarhizium brunneum*

Tabla No. 5: Análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias del peso de salerillo después de la aplicación *Metarhizium brunneum* a diferente volumen.

TRATAMIENTO	MEDIA
M.a. 0.10 l/min	1.2365 A
Ma. 0.20 l/min	1.4216 A
Ma 0.42 l/min	1.7476 A
Bionex 0.20 l/min	2.0454 A
Bionex 0.42 l/min	1.5198 A
Testigo abs.	1.9907 A
C.V. %	50.41
S.E.	NS

En el cuadro cinco se observa el ANOVA y comparación de medias evaluado con la prueba de Tukey a 0.01, de salerillo de *Bactericera cockerelli*, colectado de los plástico, en el ANOVA no se encontró significancia estadística; pero se observan diferencias numéricas donde el tratamiento en el que se observa una mayor cantidad de salerillo en el tratamiento que se le aplico BIONEX a un volumen de 0.20 l/min mientras que el tratamiento en el que se observa una menor cantidad de salerillo fue el tratamiento que se le aplico *Metarhizium brunneum* a un volumen de 0.10 l/min.

6.2.2 Aplicación de *Metarhizium brunneum* contra *Diaphorina citri* en brotes de limón

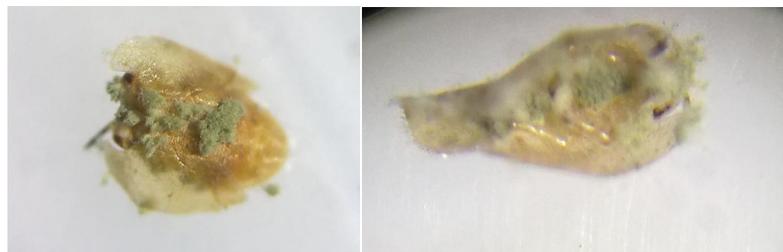
En el cuadro seis se observan los porcentajes de infección de ninfas de *Diaphorina citri* que cayeron a las trampas después de la aplicación de *Metarhizium brunneum*. En la primera aplicación a las 48 horas se obtuvo un 100 % de infección, a las 72 horas también se obtuvo un 100 % de infección mientras que a las 96 horas % se obtuvo un 60 % de infección de ninfas con el hongo entomopatógeno. De las aplicaciones del Bionex no se obtuvo infección de *Metarhizium*. En la segunda aplicación a las 48 horas se observó un 35.7 % de infección de las ninfas colectadas, para la evaluación realizada a las 72 horas se encontró un 41.1 % de infección. En cuanto a la aplicación de Bionex (testigo), no se observaron ninfas infectados por el hongo. Casique-Valdés (2010) reporta

porcentajes de infección de 40-60% al aplicar la misma cepa de *M. brunneum* contra *D. citri*.

Tabla No 6: Resultados de aplicación de *Metarhizium brunneum* contra *Diaphorina citri* en limón, para determinar porcentaje de ninfas infectadas que caen al suelo después de la aplicación.

Primera aplicación (19-02-13)		Ninfas colectadas	infectadas por M.b.	% infección
M. b	48 horas	3	3	100%
	72 horas	1	1	100%
	96 horas	5	3	60%
Bionex	48 horas	0	0	S.I
	72 horas	0	0	S.I
	96 horas	1	0	S.I
Segunda aplicación (12-04-14)				
M. b	48 horas	14	5	35.7 %
	72 horas	17	7	41.1 %
	96 horas	0	0	S.I
Bionex	48 horas	0	0	S.I
	72 horas	23	0	S.I
	96 horas	0	0	S.I

M. b= *Metarhizium brunneum*, S.I= Sin infección



Ninfas infectadas por *Metarhizium brunneum*, 9 días después de la infección

VII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en estos ensayos sugieren que la mejor producción de conidias sobre arroz de *Beauveria bassiana* se obtiene al utilizar caldo de maíz como fuente de nutrientes.

Para *Metarhizium brunneum* el caldo de soya favorece la producción de conidias en comparación con el caldo de maíz, frijol y el utilizar solo agua.

Nomurea rileyi registro mejor producción de conidias al utilizar solo arroz precocido con agua, los caldos adicionados no mostraron incremento en la obtención de conidias para este hongo.

Isaria fumosorosea, creció en los medio enriquecidos con caldo de maíz, frijol y el tratamiento testigo, sin embargo ninguno favoreció la esporulación. Mientras que el tratamiento que se le adiciono caldo de soya no mostro crecimiento micelial ni esporulación; por lo que se deben de buscar nuevas formas de producción. Cabe mencionar que *Isaria* requiere determinados niveles de iluminación para la esporulación. En este trabajo los hongos fueron mantenidos bajo poca luz, por lo que es posible que una cantidad inapropiada de luz tuvo que ver con la falta de condición de este hongo.

Al realizar aplicaciones de ultra bajo volumen (ULV) de *Metarhizium brunneum*, para determinar el porcentaje de ninfas que caen al suelo después de la infección por el hongo; el mejor resultado se obtiene al usar un volumen de 0.42 l/min. Para *Bactericera cockerelli*, este volumen de aplicación debe ser considerado al realizar el control de esta plaga. En la aplicación realizada a brotes de limón con bomba de mano a *D. citri* se obtienen resultados de infección de 100 % a las 48 y 72 horas en la primera aplicación, mientras que en la segunda aplicación se obtienen porcentajes de 35 a 42 porciento a las 48 y 72 horas respectivamente.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aguirre, O. N. Del P. 2006. Determinación del efecto de algunas fuentes de carbono y nitrógeno, del pH y de la actividad del agua sobre el desarrollo de *Nomurea rileyi*. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de Microbiología Industrial en la Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología Industrial. 4-103. pp. Colombia.
- 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 pp. Cuba.
- Álvarez, C., Martínez, C.M., Ramos, J. 1996. *Metarhizium anisopliae*: Control alternativo para el perforador del tomate. FONAIAP divulga 54. Venezuela
- Ames, De I.T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Editorial Cañedo. 60 pp. Perú
- Asaff, T. A. 2006. Producción de metabolitos insecticidas por *Paecilomyces fumosorosea* en fermentación líquida y sólida. Tesis para obtener el grado de doctor en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. 94. pp. México.
- Barajas, C. G., Del Pozo, E. M., García, H., y Méndez, A. 2010. Obtención de conidios del aislamiento MA-002 de *Metarhizium anisopliae* mediante una alternativa de cultivo bifásico. Protección vegetal. 25(3): 173-180. Pp. México
- Baraona, C.M., Barrantes, S.E. 1992. Cítricos fruticultura especial. Editorial universidad estatal a distancia. 91 pp. Costa Rica.
- Bermúdez, C.J.P. 2006. Evaluación de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok en el combate de *Imatidium*

- neivai* Bondar en palma africana (*Elaeis guineensis* Jacq). Tesis como requisito para obtener el título de: ingeniero agrónomo en la Universidad Técnica de MANABI, Facultad de ingeniería agronómica. 49 pp. Ecuador.
- Bharati. T., Kulkarni, J.H., Krishnaraj, P. U., Alagawadi, A. R. 2007. Evaluation of Food Grains and Agro Wastes for Sporulation of *Metarhizium brunneum* (Ma2). Karnataka J. Agric. Sci. 20(2): 424-425 pp. India.
- Blasco, J.M., Qureshi, J.A., Urbaneja, A. y Stansly, P.A., 2012. Predatory Mite, *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae), for Biological Control of Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). Florida Entomologist. 95(2) 278-284 pp. USA.
- Bové, J. M. 2006. Invited review huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Journal of Plant Pathology. 88(1), 7-37 pp. Brazil.
- Bustillo, A., Posa, F. 1986. Patogenicidad de un aislamiento de *Nomurea rileyi* sobre larvas del cogollero de maíz *Spodoptera frugiperda*. Revista colombiana de entomología. 12(1). 6-15. pp. Colombia.
- Carrillo, R. M.T., Blanco, L. A. 2009. Potencial y Algunos de los Mecanismos de Acción de los Hongos Entomopatógenos para el Control de Insectos Plaga. Acta Universitaria Vol. 19, Núm. 2, 40-49 pp. México.
- Casique-V. R., 2010.- Evaluación de hongos entomopatógenos y sus formulaciones contra el Psílido Asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama.- Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.
- Chan, C.W. 2009. Caracterización fisiológica y molecular de *Paecilomyces fumosoroseus* (WIZE) Brown & Smith y su patogenicidad en estadios inmaduros de *Bemisa tabaci*. Tesis presentada como requisito parcial para

obtener el grado de: Maestro en Ciencias en Horticultura Tropical, Instituto Tecnológico de Conkal.67 pp. México.

Chong, R. M. J. 2003. Utilización de medios de cultivo líquidos para la obtención de blastosporas y conidiosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomicetes) resistentes a condiciones ambientales. Tesis como requisito para obtener el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología. Universidad Autónoma de Nuevo León. 65 pp. México.

Clarkson, J., Charnley, K. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in microbiology*. 4(4). 197-203 pp. USA.

Cruz, I. Control microbial. Capítulo XXXIV uso de hongos entomopatógenos en el control de plagas. UNAN-OEA. 7-57 pp.

Curtí, D.S.A, Díaz, Z.U.A., Medina, U.V.M., Sandoval, R.J.A. 2012. Alternativas para el manejo del psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri* Kuwayama). VI Simposium Internacional Citrícola. México.

De la Torre, M., Flores M.A., Pucheta, D.M., y Rodríguez, N.S., 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Intercadencia*. 31(12). Venezuela.

Díaz, P.A., Flores, M.A., Navarro, R.S. y De La Torre, M. 2006 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia* vol. 31(12). 856-860. pp. Venezuela.

Fonseca, O., Valera, N. y Vásquez C. 2007. Registro y ciclo de vida de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en tres hospederos en el estado Lara Venezuela. *Entomotrópica*. 22(3). 145-152 pp. Venezuela.

García, D.C.S. 2009. *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae), vector de la bacteria que causa el Huanglongbing (HLB–Greening). Secretaría

de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. 18 pp. Argentina.

- García, G.D. 2012. Fluctuación poblacional de *Diaphorina citri* Kuwayana en limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka). En la sabana de Huimanguillo, Tabasco. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en ciencias. Colegio de posgraduados. 22 pp. México.
- Gatling, H.D. 1970. Distribución de los vectores psílidos de citrus greening enfermedad, con notas sobre binomia y biología de *Diaphorina citri*. PI.Prot.Bull. 18:1. 8-15 pp.
- Hajek, A.E, Leger, R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hoast. Annual Review of Entomology. 39. 293-322 pp. USA.
- Hong, W. 2003. Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Insect-cuticle degrading enzymes and Development of a new selection marker for fungal transformation. Submitted to the Combined Faculties for the Natural Sciences and for Mathematics of the Ruperto-Carola University of Heidelber, Germany for the degree of Doctor of Natural Sciences. 132 pp. Germany.
- Luján, M., Cabrera, T., Vázquez, T., Rodríguez, R.M. 1987. Esporulación del hongo *Metarhizium brunneum* en diferentes medios de cultivo. Ciencia y Tecnología en la Agricultura. 10(1). 85-91 pp. México.
- Mata, V. T. 2008. Evaluación de matrices de esporulación y formulación de un micoinsecticida a base del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Tesis presentada para obtener el grado de maestro en tecnología avanzad. Instituto Politécnico Nacional. 79 pp. México
- Méndez, A., Del Pozo, E., García, I. Y González, A. 2010. Evaluación de sustratos sólidos para la producción masiva de *Nomurea rileyi*

- (FARLOW) SAMSON. Protección Veg. 25 (2) 108-112 pp. Cuba
- Méndez, A., Del Pozo, E., Irma García, I. y González, A. 2010. Evaluación de sustratos sólidos para la producción masiva de *Nomurea rileyi* (FARLOW) SAMSON. Protección Vegetal. 50(2). Pg. 108-112. México.
- Meyer, J.M., y Hoy, M.A 2007. Low incidence of *Candidatus liberibacter asiaticus* in *Diaphorina citri* (hemiptera: psyllidae) populations between Nov. 2005 and Jan 2006: relevance to management of citrus greening disease in Florida. Florida Entomologist 90(2) 394-397 pp. USA.
- Mondaca, C.E., Lugo, A.N.E., Pérez, M.J. y Miguel Ángel Apodaca, S.M.A. 2010. Primer Reporte de Enemigos Naturales y Parasitismo Sobre *Diaphorina citri* Kuwayama en Sinaloa, México Southwestern Entomologist, 35(1). 113-116 pp. México.
- Nelson, T.L., Low, A. y Glare, T.R. 1996 Large scale production of New Zealand strains of *Beauveria* and *Metarhizium*. Plant Protection. 10(2). 257-261 pp. New Zealanda.
- Nicholls, E C.I. 2008. Control Biológico de Insectos: Un Enfoque Agroecológico. Editorial Universidad de Antioquia. 261 pp. Colombia.
- Pérez, A.W.A. 2011. Insecticidas para el control de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en toronja en la región central de Veracruz. Segundo simposio nacional sobre investigación para el manejo del psílido asiático de los cítricos y el Huanglongbing en México. 314-319 pp. México.
- Quintero, Z.I. 1998. "Producción de esporas de *Paecilomyces fumosorosea*. En diferentes medios de cultivo líquidos " T E S I S " presentada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de ciencias Biológicas. 27pp. México.

- Ramos, M.C. 2008. Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos, una perspectiva de su situación actual. OIRSA. 1-19 pp. México.
- Real, M.A.Y. 2012. Alternativas sencillas en medios de cultivo solidos alternativas para hongos entomopatógenos de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). Presentado como requisito parcial para obtener el título de Ingeniero Agrónomo Parasitólogo. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 51 pp. México.
- Rodríguez, P. M., Cambero, C.J., Robles, B.A., Carvajal, C. y Estrada, V. O. 2012. Natural enemies associated to *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) in *Citrus latifolia* Tanaka, in the state of Nayarit, Mexico. Acta Zoológica Mexicana 28(3). 625-629 pp. México.
- Samsinakova, A., Misikova, S., Leopold, J. 1971. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). Journal of Invertebrate Pathology. 18:3. 233-330 PP. USA.
- Sánchez-Peña, S. R., Casique-Valdez, R., Sánchez-Lara, B. M., Ek-Mass, J.N., Hernández-Guerra, C., Cuerti-Diaz, S. A., Loredo-Salazar, X., López-Arroyo, J. I. 2011. Aplicación en campo de hongos entomopatógenos para el control de *Diaphorina citri* en Martínez de la Torre, Veracruz, México. Memoria segundo Simposium para el manejo del psílido asiático de los cítricos y el huanglongbing en México. 245-346 pp. México.
- Sandoval, C.C.F, Quintero, Z.I, Elías, S.M, María Guadalupe Maldonado, B.M.G, Lozano, C.M y Galán, W.L.J. 2011. Producción en cultivo sólido de *Metarhizium anisopliae* en grano de arroz cocido a diferentes concentraciones de agua. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México.

- Serena, G.D.C. 2009. Distribución geográfica de *Diaphorina citri* Kuwayana. SENASA. 8 pp. Argentina.
- Sosa, A.J.M., López, M.V., Alia, T.I., Hernández, F.A.D. y Jiménez, G.D. 2011. Fluctuación poblacional del psílido asiático de los cítricos. *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: psyllidae), en 3 huertas de cítricos en el estado de Morelos. Segundo simposio nacional sobre investigación para el manejo del psílido asiático de los cítricos y el HUANGLONGBING en México. 141-146 pp. México.
- Thakre, M., Thakur, M., Malik, N. y Gange, S. 2011. Mass scale cultivation of entomopathogenic fungus *Nomurea rileyi* using agricultural products and agro wastes. *Journal of Biopesticides*, 4 (2): 176-179. pp. India.
- Tsai, J.H. y Ying, H, L. 2000. Biología de *Diaphorina citri* (Homóptera: psyllidae) en cuatro plantas hospedantes. *Journal of Economic Entomology*. 93(6) 1721-1725 pp. USA.
- Vega-Aquino, P., Sánchez-Peña, S. R., Blanco, C. A. 2010. Activity of oil-formulated conidia of the fungal entomopathogens *Nomurea rileyi* and *Isaria tenuipes* against lepidopterous larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 103. 145-149 pp. Mexico.
- Villanueva, J.J.A., Cabrera, M.H., Aguilar, R.L., Jose, P.R., Canela, C.J.J., Wenninger, E.J. y Hall, D.G. 2008. Patrones diarios y estacionales de color abdominal en *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Sociedad Entomológica de América*. 101(3) 1721-1725 pp. USA.