

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Efectividad de Hongos Entomopatógenos en el Control del Psílido Asiático de los Cítricos *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) con Énfasis en *Metarhizium brunneum* (Hypocreales: Clavicipitaceae)

Por:

FERNANDO SÁNCHEZ PEDRAZA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Efectividad de Hongos Entomopatógenos en el Control del Psílido Asiático de los Cítricos *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) con Énfasis en *Metarhizium brunneum* (Hypocreales: Clavicipitaceae)

Por:

FERNANDO SÁNCHEZ PEDRAZA

TESIS

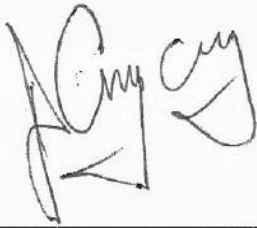
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el comité de asesoría





Dr. Sergio René Sánchez Peña
Asesor Principal



Dr. José Isabel López Arroyo
Coasesor



M.C. Reyna Ivonne Torres Acosta
Coasesor



Dr. Gabriel Gallegos Morales
Coordinador de la División de Agronomía
Coordinación
División de Agronomía
Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2015

AGRADECIMIENTOS

A mi Alma Terra Mater la “Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro” por haberme dado la oportunidad de haber pertenecido a una de las mejores universidades del país y haberme dado los conocimientos necesarios para mi futura vida profesional.

Al Dr. Sergio René Sánchez Peña por sus enseñanzas, su amistad, por orientarme a conseguir nuevas oportunidades, por su apoyo en todas las formas, GRACIAS!

Al Dr. José Isabel López Arroyo, por haber apoyado a este proyecto, GRACIAS!

A la M.C. Reyna Ivonne Torres Acosta, por apoyarme en la revisión de este proyecto, por tu amistad, tu buena vibra, tus consejos, GRACIAS!

A la MC. Denisse Ramírez Hernández, por ayudarme a la revisión de este proyecto, por tu amistad, por tu sencillez, GRACIAS!

A la MC. Adriana Patricia L. Dorantes, por sus consejos, sus enseñanzas, su amistad, GRACIAS!

Al Dr. Shawn Steffan, por haberme dado la oportunidad de una estancia en Wisconsin, GRACIAS!

Al Dr. Juan Zalapa, por sus consejos de seguir siempre para adelante, su amistad, GRACIAS!

Al Dr. Cesar Rodríguez Saona, por haberme dado la oportunidad de haber realizado una estancia en Nueva Jersey, y haber confiado en mí en el proyecto, por su amistad, por todo... GRACIAS!.

DEDICATORIA

A mis padres:

Sr. Fernando Sánchez Rivera

Sra. Bertha Pedraza Olivares

A mis hermanos y hermanas:

Iris Vanesa Sánchez Pedraza

Verónica Sánchez Pedraza

Briceida Sánchez Pedraza

Aldo Sánchez Pedraza

Miguel Sánchez Pedraza

A todos mis primos, tíos, amigos, con los cuales he compartido grandes momentos en la vida, muchos de ellos inolvidables, que me han alentado a seguir adelante y me han enseñado a ser una mejor persona:

Miguel Salgado, Adrián Sánchez, María Salgado, Lorena Pedraza, Juana Pedraza, Celia Olivares, Vicky Rivera, Eliza Flores, Mode Herrera, Fabián Quintero, J. Antonio Rodríguez, Celso Morales, Fredy Herrera, Diego Camacho, Sergio Pérez, Ricardo Mendoza, Alonso Yañes, Gerardo Rojas, Sarai Mujica, Sarahi Valero, Jaziel Pacheco, J. Carlos Rodríguez, Omar Martínez, Janet Van Zoeren, Lisa Calabrese, Lalo Cobarrubias, Norma Fraga, Rosario Avalos, Mary Philling, Kris Dahl, Evan Gunn, Andrew Lux, Andrea Carolina, Kate Brown, Elvira de Lange y la lista sigue...

La aventura no para aquí, siempre habrá algún lugar interesante donde estaremos.

CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE CUADROS	IV
RESUMEN	V
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Clasificación taxonómica de <i>Diaphorina citri</i>	3
Distribución de vector <i>Diaphorina citri</i>	4
Presencia de <i>Diaphorina citri</i> en México	4
Hospedantes.....	6
Morfología.....	6
Ciclo de vida.....	9
Comportamiento.....	10
Epidemiología.....	10
Importancia del PAC	11
Características del HLB.....	11
Importancia de la citricultura en México	13
Control	14
Control químico.....	14
Control biológico	14
Clasificación taxonómica del hongo <i>Metarhizium brunneum</i> Petch	16
Características de <i>Metarhizium brunneum</i> Petch.....	16
Modo de acción	16
Ventajas	17
Desventajas	17
Morfología colonial	18
Hábitat (cultivos)	18
Ciclo de vida	18
Susceptibilidad a pesticidas	19

Disponibilidad comercial.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Localización.....	21
Bioensayo 1. Evaluación de la mortalidad de <i>Diaphorina citri</i> en campo usando conidios de <i>Metarhizium brunneum</i> procedentes de medio artificial.....	21
Obtención de la cepa	21
Purificación y multiplicación de la cepa de <i>Metarhizium brunneum</i> en Papa Dextrosa Agar (PDA)	22
Preparación del medio de cultivo artificial (PDA)	22
Purificación y producción de <i>M. brunneum</i> en PDA	23
Aplicación en campo	23
Preparación de la solución	24
Conteo de conidios	25
Inducción de esporulación de los entomopatógenos	26
Bioensayo 2. Confrontación de hongos entomopatógenos en medio artificial (PDA)	27
Análisis de datos	30
RESULTADOS.....	31
Bioensayo 1. Evaluación de la mortalidad de <i>Diaphorina citri</i> en campo usando conidios de <i>Metarhizium brunneum</i> procedentes de medio artificial.....	31
Resultados de esporulación.....	32
Análisis estadístico.....	33
Bioensayo 2. Confrontación de hongos entomopatógenos en medio artificial (PDA).	34
DISCUSIÓN	38
CONCLUSION	40
LITERATURA CITADA.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Distribución de <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama en México de acuerdo con SENASICA (2008).....	5
Figura 2.	Huevecillos de <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama.....	8
Figura 3.	Instares ninfales <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama.....	8
Figura 4.	Adulto de <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama.....	9
Figura 5.	Distribución de los principales cítricos cultivados en México.....	13
Figura 6.	Cepas usadas durante el bioensayo y preparación de la solución.....	24
Figura 7.	Colocación de los costales para contener a los psílicos.....	26
Figura 8.	Diagrama de la posición del explante de <i>Metarhizium brunneum</i> y <i>Beauveria bassiana</i> en la caja Petri ambos a 1cm del centro y 2 cm uno del otro.....	28
Figura 9.	Diagrama de la posición del explante de <i>Metarhizium brunneum</i> en el centro de la caja Petri.....	29
Figura 10.	Diagrama del crecimiento micelial de cada hongo, medida tomada del perímetro del explante hacia el crecimiento del micelio señalamiento de donde se tomó la medida.....	29
Figura 11.	Porcentaje de mortalidad de psílicos con <i>Metarhizium brunneum</i> y un mix (<i>Metarhizium brunneum</i> , <i>Isaria fumosorosea</i> , <i>Beauveria bassiana</i>) aplicados en campo.....	31
Figura 12.	Porcentaje de esporulación de <i>Metarhizium brunneum</i> y tratamiento combinado mix (<i>Metarhizium brunneum</i> , <i>Isaria fumosorosea</i> , <i>Beauveria bassiana</i>) sobre <i>Diaphorina citri</i>	32
Figura 13.	Psílicos con los entomopatógenos esporulados A: <i>Metarhizium brunneum</i> , B: <i>Beauveria bassiana</i> , C: <i>Isaria fumosorosea</i>	33
Figura 14.	Promedios finales de crecimiento de <i>Metarhizium brunneum</i> en presencia de <i>Isaria fumosorosea</i> y <i>Beauveria bassiana</i>	35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Hospederos de <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama.....	6
Cuadro 2.	Periodos de desarrollo de <i>D. citri</i> Kuwayama; temperaturas optimas, periodos de desarrollo de <i>D. citri</i>	9
Cuadro 3.	Datos del desarrollo de <i>D. citri</i> Kuwayama con base en la temperatura.....	11
Cuadro 4.	Tratamientos formulados en el bioensayo.....	25
Cuadro 5.	Cepas utilizadas en el bioensayo.....	27
Cuadro 6.	Combinaciones realizadas en la evaluación del entomopatógeno <i>Metarhizium brunneum</i>	27
Cuadro 7.	Datos ya transformados, mediante ARCOSENO, para ajustar a la distribución normal, con trece repeticiones en cada tratamiento.....	33
Cuadro 8.	Análisis de varianza de la variable de mortalidad de <i>Diaphorina citri</i> en brotes de <i>Citrus sinensis</i> var Valencia.....	34
Cuadro 9.	Promedio de crecimiento radial final de <i>Metarhizium brunneum</i> por repetición, medidas hechas al radio que formo el micelio del hongo.....	34
Cuadro 10.	Raíces cuadradas obtenidas de los promedios finales de los hongos, con trece repeticiones en cada tratamiento.....	36
Cuadro 11.	Análisis de varianza del crecimiento micelial de <i>Metarhizium brunneum</i> en confrontación con <i>Isaria fumosorosea</i> y <i>Beauveria bassiana</i>	36
Cuadro 12.	Medias de crecimiento de <i>Metarhizium brunneum</i> e intervalos de confianza a 95% en los confrontaciones con diferentes hongos.....	37

Correo Electronico; Fernando Sánchez Pedraza, fer_5516q1@hotmail.com

RESUMEN

Este trabajo está enfocado en evaluar la patogenicidad de la cepa 6M11 del hongo entomopatógeno *Metarhizium brunneum* Petch contra el vector de la enfermedad Huanglongbing, el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama y en la interacción entre *M. brunneum* y los hongos entomopatógenos *Isaria fumosorosea* Wise y *Beauveria bassiana* Vuill.

Los hongos se obtuvieron de diferentes fuentes; *M. brunneum* se aisló del suelo, *I. fumosorosea* y *B. bassiana* se aislaron de insectos colectados en campo. Las cepas fueron aisladas, purificadas y almacenadas en el cepario del departamento de Parasitología Agrícola. Después de la producción masiva del hongo, se obtuvieron concentraciones de 1.6×10^8 conidios mL⁻¹ para *M. brunneum* y se obtuvo una combinación de entomopatógenos (*M. brunneum*, *I. fumosorosea* y *B. bassiana*) con una concentración de 1.4×10^8 conidios mL⁻¹ en porcentajes iguales de cada hongo. En la evaluación de la mortalidad de ninfas se obtuvo un porcentaje de mortalidad de 37% para *M. brunneum* y 44 % para la combinación de hongos, no hubo diferencia significativa de acuerdo a ANOVA ($P < 0.05$). En la prueba de esporulación se obtuvo para *M. brunneum* un porcentaje de insectos con micosis fúngica de 6.7% y el Mix (*M. brunneum*, *I. fumosorosea* y *B. bassiana*) con un porcentaje en conjunto de insectos micosados de 22.2% de acuerdo a esto si se encontró una diferencia significativa ente ambos tratamientos de acuerdo a la prueba Tukey. En el tratamiento aparte de los hongos combinados no se encontró ningún insecto con micosis fúngica de *M. brunneum*, solo se encontró insectos micosados con *I. fumosorosea* y *B. bassiana*.

El bioensayo donde se evaluó el crecimiento del hongo solo y en confrontaciones, para *M. brunneum* se obtuvo un promedio de crecimiento diario de 1.84 mm día^{-1} , frente a *I. fumosorosea* con 0.88 mm día^{-1} y a *B. bassiana* con 1.02 mm día^{-1} . De acuerdo a los resultados obtenidos, *M. brunneum* no fue sinergista sino que compite con otros hongos entomopatógenos, los cuales lo afectan negativamente; por lo tanto se recomienda aplicar de manera separada y evitar la inhibición por otro hongo, sin embargo se requieren más investigaciones sobre este comportamiento hacia otros hongos.

Palabras clave: *Metarhizium brunneum*, Control biológico, Huanglongbing, *Diaphorina citri*.

INTRODUCCIÓN

El hongo entomopatógeno *Metarhizium brunneum* Petch es un microorganismo que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, siendo aislado fácilmente de suelos, donde puede sobrevivir por lapsos prolongados y también ha sido aislado de una gran variedad de insectos, siendo utilizado en programas de control de plagas a nivel mundial, Mendoca (1991) menciona que este hongo es usado en gran escala en Brasil para el control del “Salivazo de la caña de azúcar” *Mahanarva posticata* desde el año 1970. En 1984 se aplicó en Brasil *M. brunneum* en 150 000ha de caña de azúcar para el control de *M. posticata*, reduciéndose el empleo de insecticidas químicos lo que fue de gran importancia para el desempeño de los enemigos naturales del barrenador de la caña de azúcar, representados por micro himenópteros (*Apanteles spp.*, y *Trichogramma spp.*) y moscas *Paratheresia spp.*, y *Metagonistylum spp.*) (Alves, 1986).

El éxito de un entomopatógeno radica en usar la cepa indicada para el organismo a controlar mediante pruebas de laboratorio, En los bioensayos se utilizan insectos criados en laboratorio con la finalidad de tener individuos completamente sanos, para realizar las sucesivas pruebas de virulencia, hasta obtener la cepa con la más alta mortalidad. La patogenicidad del hongo puede disminuir drásticamente en campo debido a factores ambientales adversos tales como la radiación ultravioleta y la baja humedad relativa (Alves, 1998). De acuerdo a Alves (1998), cuando se aplica *M. brunneum* en una zona donde no ha sido aislado, es necesario aplicar altas concentraciones para que el hongo se establezca.

M. brunneum generalmente entra a los insectos a través de la cutícula, los espiráculos y poros en los órganos de los sentidos. Una vez dentro del insecto, el hongo produce una extensión lateral de las hifas, que eventualmente proliferan y consumen el contenido interno del insecto. El crecimiento de hifas continúa hasta que el insecto se llena con micelio. Cuando los contenidos internos se han consumido, el hongo rompe la cutícula y comienza a esporular. *M. brunneum*

puede liberar esporas (conidios) bajo condiciones de baja humedad (<50%) y producir metabolitos secundarios, tales como destruxina, que tienen propiedades insecticidas en la polilla y larvas de mosca.

Algunos insectos como la langosta del desierto, han desarrollado mecanismos fisiológicos para reducir la infección por entomopatógenos como *M. brunneum*. La langosta del desierto produce toxinas anti fúngicos, que pueden inhibir la germinación de esporas. Además, los insectos pueden escapar de la infección fúngica al desarrollar un tegumento nuevo antes de que el hongo puede penetrar en la cutícula.

En esta evaluación se abordara la interacción de *M. brunneum* con el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwuyama (Hemiptera: Lividae) que es un insecto que causa daños directos por su alimentación en cítricos como naranja, limón, toronja. También es vector del patógeno que causa la enfermedad conocida como Huanglongbing. Esta enfermedad reduce la producción de los cítricos y puede matar a la planta este es un insecto cosmopolita, se refiere que está distribuido mundialmente.

Objetivo general

Determinar la patogenicidad de hongo entomopatógeno *Metarhizium brunneum* Petch para el control del psílido asiático de los cítricos (PAC) *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Liviidae) y evaluar su interacción con otros hongos entomopatógenos.

Objetivos específicos

- 1.- Determinar la patogenicidad de *Metarhizium brunneum* contra *Diaphorina citri* en campo.
- 2.- Evaluar en campo la patogenicidad de *Metarhizium brunneum* combinado con otros entomopatógenos.
- 3.- Evaluar la interacción *in vitro* de *Metarhizium brunneum* en presencia de *Isaria fumosorosea* y *Beauveria bassiana*.

REVISIÓN DE LITERATURA

El psílido asiático de los cítricos (PAC), *Diaphorina citri* (psillidae) es una plaga que afecta a los cultivos cítricos a nivel mundial (Hall, 2008). Los daños directos que sus hábitos alimenticios provoca daño en los brotes jóvenes, provoca que las hojas se enrollen y retuerzan y causa la muerte de la yema apical e impide el crecimiento normal de la planta (Gallo *et al.*, 1988), así como deformación de hojas tiernas, lo cual provoca enanismo en el árbol, caída de flores, así como falta de jugo y sabor en la fruta, el importante daño indirecto por su importancia económica está dada por ser el vector de la bacteria que provoca el HLB, altamente destructiva en las plantaciones de cítricos (Reyes, 2006).

El PAC es considerada entre las principales causas de la disminución de la producción cítrica en Asia y África (French *et al.* 2001). La enfermedad, originaria de Asia fue reportada recientemente para el Hemisferio Occidental en São Paulo, Brasil en el 2004 y Florida, Estados Unidos en el 2005.

Clasificación taxonómica

Clasificación Taxonómica de *Diaphorina citri* Kuwayama (1970) de acuerdo a Triplehorn y Johnson (2005).

Reino: Animalia
Filum: Artrópoda
Clase: Insecta
Orden: Hemíptera
Familia: Liviidae
Género: *Diaphorina*
Especie: *D. citri* Kuwayama

Distribución del vector

El PAC evolucionó en India en asociación con una especie del género de *Murraya*, y fue descrito por primera vez en Taiwán en 1907 (Halbert y Manjunath, 2004). Actualmente, es un insecto plaga con categoría cuarentenaria y está establecido ampliamente en las zonas citrícolas del mundo.

El PAC; *Diaphorina citri* tiene una amplia distribución en América, ha sido reportada en Argentina por primera vez en 1984 (Vaccaro, 1994). Está establecido en América del Norte, Centro América y Sur América. Se ha reportado en Brasil, Uruguay, Honduras, Belice, Cuba, Guadalupe, Estados Unidos de América, Republica Dominicana, y México (Halbert y Núñez, 2004; Halbert y Manjunath, 2004). Los hospederos incluyen miembros de la familia Rutaceae, a la cual pertenecen los cítricos y la planta ornamental llamada Limonaria (*Murraya paniculata* (L.) Jack) usada principalmente en jardines.

Presencia del PAC en México

El PAC fue encontrado en México durante el año de 2002 en los estados de Campeche y Quintana Roo y desde entonces se ha distribuido ampliamente en todas las áreas citrícolas del país. En el año 2003, fue observado en los estados de Nuevo León y Tamaulipas, para el año 2004, *D. citri* se extendió a Colima, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Yucatán (López- Arroyo *et al.*, 2005).

En 2006 el insecto fue encontrado en Sonora y Baja California sur (Martínez, *et al.* 2008). En Junio de 2008, se reportó la presencia de este insecto en la zona urbana de Tijuana, Baja California (Dirección General de Sanidad Vegetal y Sistemas de Alerta Fitosanitaria de la NAPPO, 2008), lo que demuestra que en tan solo seis años de 2002 a 2008 el insecto se desplazó por todo el

territorio nacional. Durante Julio de 2008, el insecto fue observado alimentándose en árboles dispersos y escasos en jardines del área rural del estado de Coahuila, lejos de cualquier zona citrícola (López-Arroyo *et al.* 2005).

En la figura 1 se presenta la distribución de *D. citri* en México. Los datos indican que actualmente se encuentra presente en 688 municipios del territorio nacional (SENASICA, 2010).



Figura 1. Distribución de *Diaphorina citri* Kuwayama en México de acuerdo con SENASICA (2010).

Hospedantes

Las plantas preferidas del insecto vector se enlistan a continuación (cuadro 1), existiendo una mayor cantidad de hospederas de la plaga y del HLB que se mencionan en la norma oficial mexicana de emergencia NOM-EM-047-FITO-2009.

Cuadro 1. Hospedantes de *Diaphorina citri* Kuwayama

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

Morfología

Los huevecillos recién depositados son de color amarillo claro brillante y se tornan a brillante anaranjado (Figura 2). 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, sobre y entre las hojas desplegadas, apareciendo con

frecuencia un gran número en un mismo brote, una hembra puede llegar a ovipositar más de 800 huevecillos.

Este insecto pasa por cinco instares ninfales (Figura 3), que varían en tamaño después de cada muda. El último instar se caracteriza por presentar los primordios alares de mayor tamaño. Las ninfas son de color anaranjado-amarillo, sin manchas abdominales, aplanadas dorso ventralmente, con esbozos alares (alas pequeñas en formación) abultados, un par de ojos rojos compuestos y dos antenas de color negro. Presentan filamentos a lo largo del abdomen. Los primordios de las alas son conspicuos; hilos cerosos cortos, pueden estar presentes sólo en el ápice del abdomen. Se alimentan de tejidos tiernos y pueden doblar las hojas en desarrollo para protegerse durante el proceso de alimentación. El ciclo ninfal se puede completar en 15 días bajo condiciones adecuadas de temperatura de 28° C. En períodos secos los adultos pueden ser abundante en tanto que las ninfas están ausentes (Alemán et al., 2007). Se ha reportado que las ninfas no transmiten el HLB en el campo, aunque pueden adquirirlo cuando se alimentan en plantas infectadas y después lo transmiten como adultos. Sin embargo, las ninfas de instares tardíos pueden transmitir la bacteria cuando bajo condiciones experimentales se mueven de plantas infectadas a plantas sanas. El mayor movimiento de insectos adultos es dentro de la planta hospedera o a planta.

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. En el quinto 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).

Los machos son levemente más pequeños que las hembras, mientras que el abdomen de las hembras termina en punta bien marcada (Figura 4). El tamaño del insecto es de 3-4 mm., tiene la cabeza de color café claro (marrón) o pardo,

antenas largas con puntas negras y dos manchas grises (casi negras) en los segmentos medios del abdomen. El cuerpo es de color gris y el abdomen de las hembras se torna rojizo o anaranjado antes de ovipositar. Las alas son de color marrón con patrones de manchas distintivos, con poca venación y la cabeza es café marrón para el PAC y negra para el psílido africano (Mead, 1977).

Los adultos brincan cortas distancias cuando son molestados, se conoce que estos insectos viven varios meses esperando las brotaciones de los cítricos o plantas hospedantes (Halbert y Manjunath, 2004).



Figura 2. Huevecillos de *Diaphorina citri* Kawayama
(Imagen tomada de David Hall, USDA-ARS, Ft. Pierce, FL).



Figura 3. Instares ninfales *Diaphorina citri* Kuwayama
(Imagen tomada de David Hall, USDA-ARS, Ft. Pierce, FL).



Figura 4. Adulto de *Diaphorina citri* Kuwayama (Imagen tomada de David Hall, USDA-ARS, Ft. Pierce, FL).

Ciclo de vida

La duración de su ciclo biológico, comenzando con el periodo de incubación hasta el estado adulto (Figura 5), se encuentra relacionado con las oscilaciones de la temperatura en cada estación del año y está condicionado con la presencia de brotes jóvenes ya que estos son los más susceptibles a la ovoposición.

Cuadro 2. Periodos de desarrollo de *Diaphorina citri* Kuwayama.

Característica del periodo	Días	Temperatura (°C)
	10	15
Duración del periodo embrionario	4	28
	14	28
Duración del ciclo biológico (huevo-adulto)	49	15

Comportamiento

La temperatura, humedad relativa y el contenido nutricional de las hojas son factores determinantes del incremento de los niveles de poblacionales del PAC. Hasta el momento no se ha encontrado en 1300–1500 m. arriba del mar, debidos a las heladas ocasionales (Aubert, 1987).

La posición del insecto sobre el brote es una característica típica para identificar al psílido. Los adultos, se alimentan en una posición inclinada con la cabeza pegada al sustrato y el cuerpo levantado, logran brincar cortas distancias cuando son molestados. Los adultos del PAC pueden vivir varios meses esperando las brotaciones de los cítricos o plantas hospedantes para iniciar la reproducción (Halbert y Manjunath, 2004).

El PAC tiene alta fecundidad, las hembras son capaces de depositar varios huevos por día, los cuales eclosionan a los 3 días en verano y hasta los 23 días en invierno (Mead, 1977). El ciclo de vida varía de 14 a 50 días dependiendo de las condiciones de temperatura de la época en que se desarrolla.

Epidemiología

Este insecto es transmisor de la enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB) en cítricos. Ninfas y adultos se desarrollan en brotes tiernos de plantas hospederas, tiene una alta tasa de natalidad, las ninfas producen ondulaciones de cera que nos ayuda a identificar la presencia del insecto en los brotes. Las fases en que adquiere la bacteria: son el 4to. y 5to. Instar ninfal y el adulto. No transmite la enfermedad a la descendencia, solamente los adultos la transmiten hasta el final de su vida.

Los datos del desarrollo de *Diaphorina citri* en base a temperatura fueron evaluados por Liu y Tsai (2000) señalan que bajo condiciones de laboratorio se desarrollan más rápidamente, el cual se presentan en el anexo (Cuadro 2).

Cuadro 3. Datos del desarrollo de *Diaphorina citri* Kuwayama con base en la temperatura. Liu y Tsai (2000).

Etapas	Intercepto	Pendiente	R2	Tbº C	Grados-día
Huevo	-0.1326	0.0148	0.97	8.96	67.57
1er. Instar	-0.4415	0.0378	0.98	11.68	26.46
2do. Instar	-0.4429	0.0415	0.99	10.67	24.1
3er. Instar	-0.3364	0.0332	0.87	10.13	30.17
4to. Instar	-0.2702	0.0258	0.92	10.47	38.76
5to. Instar	-0.1761	0.0158	0.94	10.86	63.29
Ninfa	-0.0584	0.0054	0.99	10.81	185.19
Huevo Adulto	-0.0418	0.004	0.99	10.45	249.88

Importancia del PAC

El psílido asiático de los cítricos es una plaga importante a nivel mundial, debido a que es el vector de la enfermedad conocida como Huanglongbing. Representa una seria amenaza para México debido a que este país es productor y exportador de cítricos a nivel mundial.

Características del HLB

El “Huanglongbing” que en mandarín significa enfermedad de los brotes amarillos, por la presencia de ramillas amarillentas en las plantas de cítricos

enfermas, (Halbert, 1999; Da Graca, 1991; Da Graca y Korsten, 2004; Halbert y Manjunath, 2004), es considerada actualmente como la enfermedad más devastadora de los cítricos en el mundo (Halbert y Manjunath, 2004; Bové, 2006; Beattie et al., 2008; Da Graça, 2008). Actualmente no se conoce cura para los árboles infectados con HLB, los que en poco tiempo se vuelven decadentes e improductivos y finalmente mueren. Se reportan más de 63 millones de árboles muertos por causa de esta enfermedad, principalmente en Asia, Sudáfrica y Brasil, donde se han presentado epidemias. De acuerdo con Da Graça (2010) el origen de la enfermedad es poco claro ya que los cítricos no son considerados el huésped original de esta enfermedad reciente y no se ha encontrado tolerancia o resistencia natural en este cultivo con más de 4,000 años de antigüedad. A largo plazo, la resistencia genética en las nuevas variedades comerciales es la mejor opción (Da Graca, 2010). El HLB está distribuido en prácticamente todos los países productores de cítricos (Figura 1), excepto en aquellos de la cuenca del Mediterráneo, del oeste de Asia y Australia (Bové, 2006).

Los síntomas de HLB son variados y se pueden parecer a los de otros desordenes en las plantas de cítricos, sin embargo, hay algunas características específicas. Los árboles afectados usualmente desarrollan uno o más brotes amarillos, de ahí el nombre de la enfermedad. Las hojas afectadas desarrollan un patrón de áreas amarillas y verdes sin límites definidos, dando apariencia de un moteado ("manchas") con un patrón asimétrico, siendo el síntoma más característico en hojas de árboles enfermos. Las hojas también pueden llegar a ser más gruesas, con venas dilatadas y apariencia corchosa. En etapas avanzadas, desarrollan síntomas parecidos a deficiencias de zinc, seguida de caída de las hojas y muerte regresiva de las ramillas. Los árboles muy afectados por la enfermedad también presentan excesiva caída de fruta. En los árboles con síntomas avanzados, las frutas son pequeñas, deformes y al madurar la punta estilar permanece verde, de ahí el nombre de "greening". Al seccionar una fruta por la mitad, en un corte longitudinal, se pueden observar semillas pequeñas,

oscuras y abortadas. La piel de la fruta, especialmente en naranja dulce, puede tener un aspecto moteado (Gottwald *et al.* 2007; González-Mora *et al.*, 2010).

Importancia de la citricultura en México

Una de las actividades agrícolas más importantes en México es la citricultura, nuestro país ocupa el cuarto lugar en producción de cítricos a nivel mundial (Figura 6). Se reporta una superficie de 526 mil hectáreas de estos frutales, distribuidas en 23 Entidades Federativas, con una producción de 6.7 millones de toneladas anuales, y un valor superior a los 8 mil 50 millones de pesos. (SENASICA, 2010). México tiene el primer lugar en producción de limón “mexicano” y el segundo en limón “persa”. En la producción nacional de limón, naranja, mandarina, toronja y lima participan 67 mil familias mexicanas, donde se generan 70 mil empleos directos y 250 mil indirectos. La citricultura es una actividad redituable en aspectos económicos para el productor, ecológicos al no utilizar demasiados agroquímicos como en otros cultivos e importante desde el punto de vista social al generar mano de obra durante todo el año.

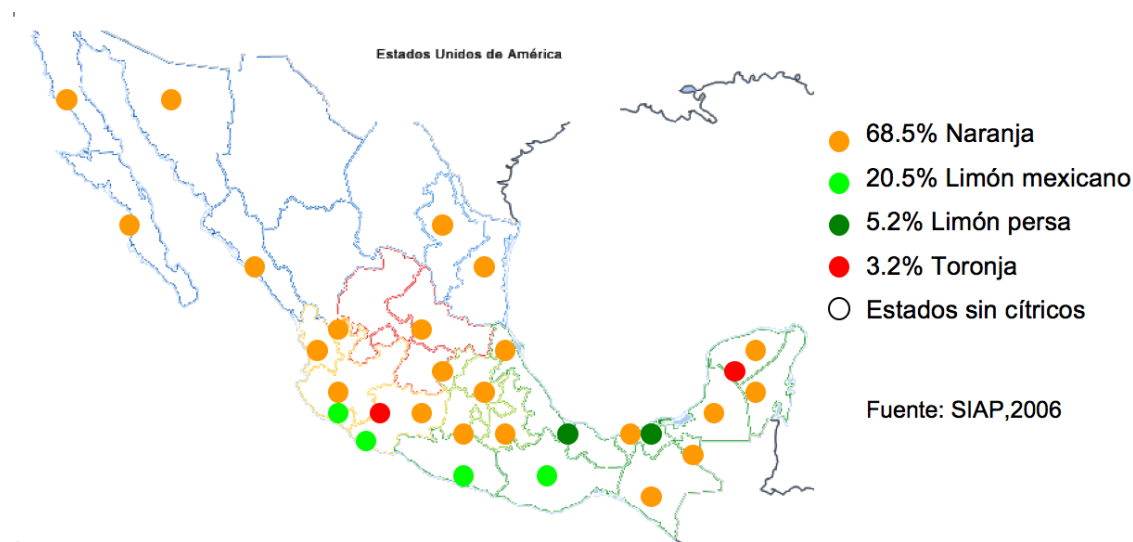


Figura 5. Distribución de los principales cítricos cultivados en México

Control

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

Control químico

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 insecticidas a principios de 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 periodos 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.

Control biológico

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, predadores y hongos entomopatógenos. Se han introducido parasitoides como *Tamarixia radiata* y *Diaphorencyrtus aligarhensis*, depredadores como *Chilocorus cacti*, *Olla v-nigrum*, *Harmonia axyridis* 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 sanguínea* y *Olla v.nigrum*). Mientras que en condiciones de laboratorio se ha utilizado *Amblyseius swirskii* para control de *Diaphorina citri*, observándose un alto porcentaje de mortandad (Blasco et al. 2012).

Los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial como agentes de control; constituyen un grupo con más de 750 especies que al dispersarse en el ambiente provocan infecciones fúngicas a las poblaciones de insectos (Díaz et al. 2006). Por ello son ampliamente reconocidos por su potencial como agentes de biocontrol, debido a que la mayoría de los insectos son susceptibles a enfermedades fungosas y a su modo de infección distintivo a diferencia de otros agentes como bacterias, virus y protozoarios; debido a que no requieren ser ingeridos para causar infección; en su lugar las esporas germinan y pueden penetrar directamente la cutícula por lo que son catalogados como insecticidas de contacto además de que todas las estructuras (conidios, micelio y blastosporas) tienen potencial de ser usados como agentes de control. Este modo de infección es posible gracias a la acción coordinada de enzimas hidrolíticas, además de la presión mecánica ejercida en el punto de contacto por lo que las enzimas son determinantes en el éxito de la infección (Carrillo y Blanco, 2009).

Clasificación Taxonómica del Hongo *Metarhizium brunneum* Petch.

Reino: Fungi

Filum: Ascomycota

Subfilum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Metarhizium*

Especie: *M. brunneum* Petch

Características del hongo *Metarhizium brunneum* (Petch).

El género *Metarhizium* es el agente causal de la muscardina verde. *M. brunneum* es un entomopatógeno que afecta a más de 200 especies de insectos en siete ordenes; se caracteriza por la formación de varios conidios encima del estigma. En esta especie con frecuencia ocurre la heterocariosis cuyo resultado es la diferencia en cuanto a la virulencia de las variedades. Este hongo produce quitinasa, lipasa y proteasa para la penetración de la cutícula en los insectos, y dos toxinas denominadas Destruixinas y Citocalasinas. Los insectos mueren debido a la pérdida de nutrientes y por la acción de las toxinas (Alves, 1988).

Modo de acción

El modo de acción del *M. brunneum* se distinguen dos fases: patogénica y otra saprofitica (Leucona, 1996).

La fase de patogénesis se presenta cuando los conidios entran en contacto con el tejido del hospedante y se produce la infección principalmente por vía oral,

o a través de los espiráculos y de forma muy particular atravesando la superficie del tegumento de insectos (Alves, 1988).

M. brunneum requiere un rango de 24 a 30 °C, para su crecimiento y esporulación, y puede morir con temperatura de 49 °C. Se ha verificado que *M. brunneum*, esporula muy bien sobre insectos colonizados y colocados entre 40 a 60% de humedad relativa, principalmente en temperaturas superiores a 30 °C, y las epizootias están siempre correlacionadas con la alta humedad relativa (70 a 100%), como acontece con otros patógenos (Alves, 1988).

El amplio espectro de acción y capacidad para crear epizootias hacen de este patógeno un elemento eficaz y apreciado en el control fitosanitario. En Cuba se emplea con mucho éxito en el control del picudito acuático del arroz (*Lissorhoptus brevis*). Según Alves (1988), la utilización de estos patógenos para el control de insectos presenta una serie de ventajas y desventajas, señalando las siguientes:

Ventajas

Son específicos, se multiplican y se dispersan con facilidad, causan efectos secundarios, control más persistente, control asociado, aplicación fácil, no son tóxicos para el hombre y otros animales, los insectos difícilmente podrán tornarse resistentes a los patógenos.

Desventajas

Son antieconómicos a corto plazo, inicialmente necesitan varias aplicaciones sobre la plaga, necesitan condiciones favorables (temperatura, humedad, luminosidad, etc.) para causar epizootias, exigen mayor cuidado de almacenamiento.

Morfología colonial

El hongo crece en el tegumento de artrópodos y forma estructuras reproductivas. Inicialmente, sólo se ve hifas de los hongos que aparecen en blanco, pero, como forma de conidias y madurar a menudo adquieren un característico color verde oliva. Sin embargo, dependiendo de la especie y cepa de *M. brunneum*, las esporas pueden variar en color desde blanco a amarillo a marrón y verde (Tanada y Kaya, 1993).

Hábitat (Cultivos)

El género *Metarhizium* son comúnmente considerados como saprófitos del suelo y con mayor frecuencia se encuentran en hábitats perturbados como los campos agrícolas, en comparación con los ecosistemas forestales (Meyling y Eilenberg, 2007). Además, resultados recientes sugieren que estos hongos formar asociaciones con raíces de las plantas en la rizosfera (Hu y St. Leger, 2002) y sobreviven mejor en el entorno que rodea que en suelo del encapsulamiento durante períodos de tiempo prolongados (Bruck, 2005).

Ciclo de vida

En general los hongos entomopatógenos desarrollan las siguientes fases sobre su hospedante: germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción.

El proceso se inicia cuando la espora o conidia se adhiere a la cutícula del insecto, luego desarrolla un tubo germinativo y un apresorio, con este se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto y la germinación ocurre aproximadamente a las 12 horas de inoculación y la formación de apresorios se presenta de 12 a 18 horas post-inoculación. En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración, lo que facilita el ingreso del hongo. Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizando completamente la cavidad del cuerpo del insecto, esto sucede en 3 o 4 días después de la inoculación. A partir de la colonización se forman pequeñas colonias y estructuras del hongo, lo que corresponde a la fase final de la enfermedad del insecto, ocurre 4 o 5 días después de la inoculación (Hajek y Leger, 1994).

Susceptibilidad a pesticidas

El efecto de los fungicidas sobre las especies *de Metarhizium spp.*, puede ser variable, si hay alguna duda en cuanto al efecto de un fungicida o insecticida sobre la viabilidad de productos de especies *de Metarhizium*, los usuarios deben errar por el lado de la precaución y no utilizar mezclas de tanque. Bruck (2009), informó sobre la persistencia de conidios de *Metarhizium ssp.* en placas de Petri, al entrar en contacto con varios fungicidas comúnmente usados en invernaderos y viveros. Si bien un gran número de fungicidas impactan negativamente a la germinación de los conidios y el crecimiento del micelio en placas de Petri, en esta

prueba hubo un mínimo efecto en la rizosfera después de dos aplicaciones de algunos fungicidas.

Disponibilidad Comercial

Entre octubre de 2005 y mayo de 2006, Faria y Wraight (2007), determinó que había 47 diferentes productos disponibles en forma comercial a base de *Metarhizium* disponibles en todo el mundo. Debido a los cambios taxonómicos recientes a *Metarhizium* (Bischoff et al. 2009), no es posible determinar la composición exacta de las especies de la lista. Sin embargo, a partir de 2007 muchos de los diferentes productos fueron clasificados como *M. anisopliae* o *M. anisopliae* var. *acridum*, que se basa en Green Muscle. Esta variedad es activo contra las langostas y saltamontes y ahora es reconocida como su propia especie *M. acridum*. La cepa de *M. anisopliae* que es la base para Met52 (Novozyme Biologicals) se reconoce ahora como *M. brunneum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

La presente investigación se llevó a cabo de Agosto del 2013 a Mayo del 2014. La investigación se realizó en dos fases, la primera se efectuó en los laboratorios y cámaras bioclimáticas número 0 y 8 del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), ubicada en Buenavista, a 7 Km al sur de la Ciudad de Saltillo, Coahuila, México.

La segunda fase, correspondiente a la suspensión de esporas se efectuó en el laboratorio del INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) ubicado en el municipio de General Terán del estado de Nuevo León, México (25°18'23''N, 98°39'06''W). La aplicación del bioplaguicida en campo se realizó en huertas particulares de naranja (*Citrus sinensis* var. Valencia) ubicadas cerca de los terrenos del INIFAP.

Bioensayo 1. Evaluación de la mortalidad de *Diaphorina citri* en campo usando conidias de *Metarhizium brunneum* procedentes de medio artificial.

1.1. Obtención de las cepas

Para realizar la evaluación de mortalidad de *Diaphorina citri*, se utilizaron tres cepas: *Metarhizium brunneum* Petch (cepa 6M11), *Isaria fumosorosea* Wize (cepa IF8B19) y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (cepa B6C), a continuación se presentan los datos de aislamiento para cada cepa.

M. brunneum Petch (cepa 6M11) fue aislada a partir de insectos trampa (*Tenebrio molitor* (Coleóptera: Tenebrionidae)) en muestras de suelo provenientes de huertos cítricos provenientes de Yerbaniz, Santiago, Nuevo León, México

(25°30'04"N, 100°11'40"W). La metodología para el aislamiento de hongos entomopatógenos fue propuesta por Sánchez-Peña, *et al.* (2011), donde las muestras de suelo colectadas se pusieron en vasijas o contenedores de 500 ml de plástico y se les agregó 100 ml de agua para se mantuviera húmedo por lo menos dos días. Después se les colocó una o dos larvas de *T. molitor*, Después de dos días se les revisó la humedad, pues los hongos necesitan humedad necesaria para desarrollarse, a las muestras de suelo y se monitoreó la cantidad de larvas vivas y muertas, este proceso se repitió cada dos días hasta que se observará si alguna larva no presentó signos de vida, se separaron los insectos y se colocaron en cámara húmeda y se esperó un tiempo prudente hasta que se observaran signos de micosis por hongos entomopatógenos. Se obtuvo *Metarhizium spp.*, pues logró esporular de una de las larvas que pusimos en los contenedores, tiempo después, gracias al análisis genético de *Metarhizium sp.*, obtuvimos la cepa, la cual fue *M. brunneum*.

I. fumosorosea Wize (cepa IF8B19), fue aislado de *Diaphorina citri* en San Pedrito, Gómez Farías, Tamaulipas, México (22°59'33"N, 99°8'34.82"W) y *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin (cepa B6C), fue aislado de un chapulín presentando signos de infección por entomopatógenos en campos agrícolas de la UAAAN-Saltillo, Coahuila, México (25°21'30"N, 101°02'20"W).

1.2. Purificación y multiplicación de la cepa de *Metarhizium brunneum* en Papa Dextrosa Agar (PDA)

1.2.1. Preparación del medio de cultivo artificial (PDA)

Para preparar un litro de PDA, se pesaron 39 g en una balanza analítica para mayor precisión y se vació en un matraz con agua previamente calentada para su mejor dilución, agitando suavemente para deshacer grumos, se le puso papel aluminio y se introdujo en la olla de presión para su esterilización a 121 °C

por 15 minutos, posteriormente se vaciaron 20mL del medio de cultivo en cajas Petri estéril.

1.2.2. Purificación y producción de *Metarhizium brunneum* en medio de cultivo artificial.

Para purificar la cepa, se tomaron bajo condiciones conidias del insecto micosado con un asa bacteriológica y sembrándolas en medio de cultivo artificial (PDA). En esta fase, es fácil encontrar bacterias y otros hongos no deseados, por lo cual se volvió a tomar el hongo entomopatógeno con un asa bacteriológica y fue resembrado en una nueva caja Petri, de esta manera en el tercer traspaso solo se obtuvo la cepa purificada de *M. brunneum*. El hongo fue transferido en el medio de cultivo PDA usando la técnica de estría, la cual consiste en tomar conidios con un asa bacteriológica y esparcirlos en el medio de cultivo en forma de zig-zag. Las cajas Petri fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta la esporulación, después de esto se almacenaron en un ambiente frío 4-6° C para evitar la contaminación con bacterias, ácaros o cualquier otro agente que pueda afectar a los cultivos de hongos. Mediante procedimientos similares se cultivaron las cepas de *B. bassiana* e *I. fumosorosea*.

1.3 Aplicación en campo

La aplicación se realizó en el municipio de General Terán en el estado de Nuevo León, por ser una zona citrícola con presencia alta de *D. citri*.

La formulación de los hongos entomopatógenos se realizó en los laboratorios del campo experimental “General Terán” pertenecientes al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) que se localiza en el municipio de General Terán en el estado de Nuevo. La aplicación de los entomopatógenos en campo, se realizó en predios de naranja (*Citrus sinensis*

var. Valencia), ubicadas a 25°17'23"N, 99°39'08"W en el municipio de General Terán, Nuevo León, México.

1.3.1 Preparación de la solución

Para la formulación del hongo se utilizaron 10 cajas Petri de *M. brunneum*. Las conidias obtenidas de estas cajas Petri se cosecharon y suspendieron en agua purificada, más el surfactante Bionex (0.05% v/v) (Arysta Lifesciences, Saltillo). La suspensión se mezcló en una licuadora, esto con el propósito de dispersar las esporas y obtener una solución uniforme. Posteriormente se estimó la cantidad de esporas por mililitro del formulado. Lo anterior se realizó también con *I. fumosorosea* y *B. bassiana* (Figura 6).

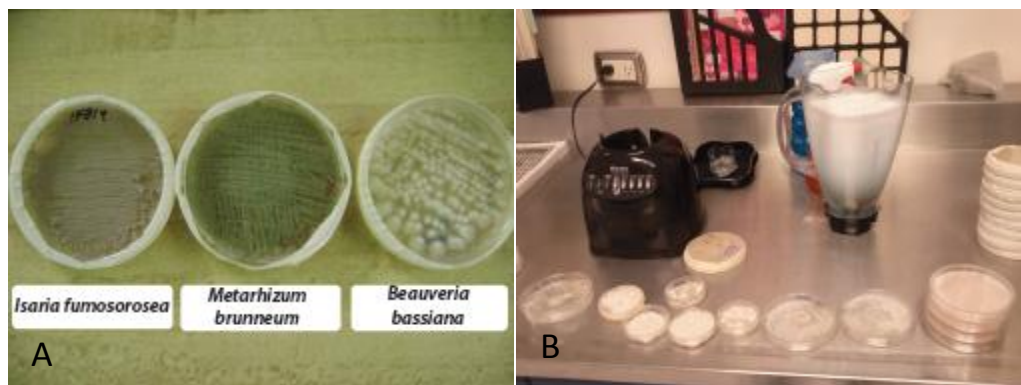


Figura 6. A: Cepas usadas durante el bioensayo. B: Preparación de la solución.

Se realizaron 3 tratamientos: El primer tratamiento se formuló con 200 ml de solución de *M. brunneum*, el segundo tratamiento fue una mezcla de hongos entomopatógenos utilizando a *M. brunneum* (6M11), *I. fumosorosea* (IF8B19), y *B. bassiana* (B6C) mezclados en proporciones iguales, cada uno a una concentración de 1×10^8 ; a este tratamiento se le llamó Mix de hongos entomopatógenos y el tercer tratamiento fue el testigo el cual contenía agua estéril + Bionex (0.05% v/v).

1.3.2 Conteo de conidios

Se realizó con la cámara Neubauer (Hemocitómetro), para contar los conidios con un microscopio con un aumento de 400x siguiendo la técnica descrita por Goettel e Inglis (1994) para obtener la cantidad por ml (cuadro 4).

Cuadro 4. Tratamientos formulados en el bioensayo.

Tratamiento	N	Concentración conidios/ml	Cepa
Testigo (agua+ Bionex)	13	0.05% v/v	-
<i>Metarhizium brunneum</i>	13	1.19×10^8	6M11
Mix de hongos entomopatógenos	13	1.40×10^8	6M11, IF8B19 y B6C

Cabe mencionar que en el mix de hongos entomopatógenos, se combinaron partes (volúmenes) iguales de los tres hongos, por lo que cada hongos tenía una concentración de 4.6×10^7 . El bioensayo se realizó el día 16 de octubre del 2013 entre 3 y 5 pm, con una temperatura media de 26 °C y una humedad relativa de 84%. Se capturaron psílicos adultos con aspiradores manuales y fueron colocados en bolsas de malla (15 cm diámetro x 30 cm largo) (Figura 8) para conservarlos vivos, cada bolsa contenía 20 psílicos, la captura de psílicos se hizo con la ayuda de colaboradores del INIFAP.

En el bioensayo de campo se usaron 20 árboles de naranja (*Citrus sinensis* var. Valencia) de aproximadamente 25 años de edad y 13 bolsas de malla con psílicos por tratamiento, siendo un total de 39 bolsas de malla con psílicos. El diseño del experimento fue bloques totalmente al azar. Se colocaron 2 bolsas de malla por árbol, una en cada lado (norte y sur), cubriendo brotes frescos y se asperjaron los brotes con las soluciones ya formuladas usando un atomizador de la marca Viton 100 ml de solución.



Figura 7. Colocación de los costales para contener los psílicos.

Una semana después de la aplicación el 23 de octubre del 2013 con una temperatura media de 18 °C y una humedad relativa de 69%, se cortaron las ramas donde se colocaron las bolsas de malla con los psílicos. Las bolsas se trasladaron inmediatamente a los laboratorios de la Universidad en Saltillo, donde se hizo el conteo de psílicos muertos. Los ejemplares muertos fueron puestos en cámaras húmedas a una temperatura promedio de 25 °C durante dos semanas, después de este tiempo se tomó el porcentaje de esporulación en base a los insectos que presentaban visiblemente micelio o una infección micótica avanzada.

Bioensayo 2. Confrontación de hongos entomopatógenos en medio artificial (PDA).

Se utilizaron para este bioensayo las siguientes cepas de hongos entomopatógenos:

Cuadro 5. Cepas utilizadas en el bioensayo.

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

Para evaluar el crecimiento de *M. brunneum* en medio artificial PDA ante otros entomopatógenos se utilizaron 12 discos de micelio de cada cepa en cada confrontación tomados de cajas Petri con crecimiento micelial con edad de uno a tres días. Las combinaciones de *M. brunneum* con otros entomopatógenos se presentan en el cuadro 6.

Cuadro 6. Combinaciones realizadas en la evaluación del entomopatógeno *Metarhizium brunneum*.

combinaciones	repeticiones
<i>M. brunneum</i>	12
<i>M. brunneum</i> vs <i>I. fumosorosea</i>	12
<i>M. brunneum</i> vs <i>B. bassiana</i>	12

Las confrontaciones se realizaron bajo condiciones estériles. Los discos o explantes de *M. brunneum* fueron cortados mediante un sacabocados de 10 mm. Posteriormente con un asa bacteriológica estéril se tomó cada explante y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo artificial PDAL uno enfrente de otro a 1cm del centro de la caja (Figura 9).

En 12 cajas Petri se colocó 1 explante por caja de *M. brunneum*, y 1 explantes de *I. fumosorosea* a 1cm del centro y 2cm uno del otro (figura 10). Las ultimas 12 cajas se colocaron de igual manera el explante de *M. brunneum* y *B. bassiana* a la misma distancia uno del otro (Figuras 8 y 9).

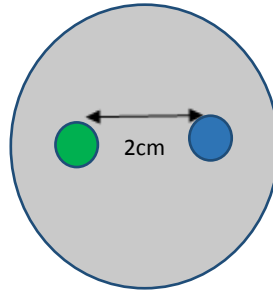


Figura 8. Diagrama de la posición del explante de *Metarhizium brunneum* (circulo verde) e *Isaria fumosorosea* o *Beauveria bassiana* (circulo azul) en la caja Petri ambos a 1cm del centro y

En 12 cajas Petri se sembró únicamente explantes de *M. brunneum* en el centro de la caja utilizando estas cajas como testigo (Figura 10).

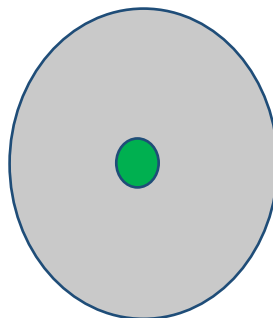


Figura 9. Diagrama de la posición del explante de *Metarhizium brunneum* en el centro de la caja Petri.

Las cajas Petri inoculadas con las dos combinaciones y el testigo (*M. brunneum*) fueron colocadas en oscuridad, para posteriormente observar el desarrollo de los hongos.

El radio del crecimiento de micelio fue medido, la medida se hizo con dirección al otro hongo diariamente por 5 días (Figura 11. Al final se obtuvo un promedio de crecimiento de los 5 días.

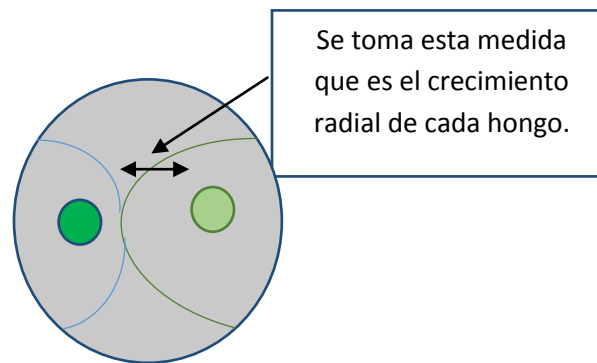


Figura 10. Diagrama del crecimiento micelial de cada hongo. Medida tomada del perímetro (borde) del explante en dirección al otro hongo.

2.1 Análisis de datos

La mortalidad de los psílidos fue corregida mediante la fórmula de Schneider-Orelli y estandarizados a proporciones. Para la segunda prueba *in vitro* se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA), y separación de medias usando la prueba de Tukey, utilizando el paquete estadístico SPSS.

Se corrigió la mortalidad con la fórmula de Schneider-Orelli, posteriormente se obtuvieron porcentajes, que fueron transformados a proporciones; aplicamos transformación de datos para corregir normalidad, con arcoseno (función

ARCSINE de SPSS), y los datos transformados se analizaron mediante la prueba de ANOVA.

Para transformar los datos se obtiene el arcoseno (inverso del seno) de la raíz de la proporción ($\arcsen\sqrt{p}$), siendo p es el valor proporcional de los datos originales (los porcentajes deben dividirse entre 100). Las unidades de los valores transformados son grados o radianes.

RESULTADOS

Bioensayo 1. Evaluación de la mortalidad de *Diaphorina citri* en campo usando conidias de *Metarhizium brunneum* procedentes de medio artificial.

La mortalidad de los psílicos fue expresada en porcentajes. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: *M. brunneum* obtuvo un porcentaje de mortalidad de 85%, para el Mix de tres entomopatógenos se obtuvo un porcentaje de 100% de mortalidad y para el testigo (Agua esteril + Bionex) tuvo una mortalidad de 44.9 %.

Se muestra el porcentaje de mortalidad corregida que se obtuvo en los diferentes tratamientos de la aplicación de hongos entomopatógenos en campo contra el psílido (Figura 13). El testigo (agua+bionex) tuvo el menor porcentaje de mortalidad corregida con 0% (mortalidad corregida), en comparación con el tratamiento de *M. brunneum* con 37% y el tratamiento que incluimos tres hongos (*M. brunneum*, *I. fumosorosea* y *B. bassiana*) se obtuvo el 44% de mortalidad, la baja mortalidad pudo depender de la baja humedad relativa que se registró en esos días.

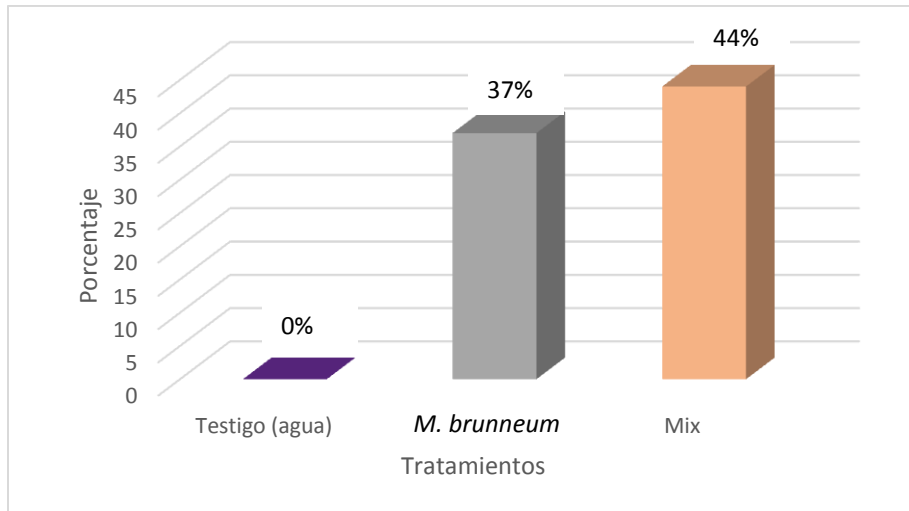


Figura 11. Porcentaje de mortalidad de psílidos inoculados con *Metarhizium brunneum* y un mix (*Metarhizium brunneum*, *Isaria fumosorosea* y *Beauveria bassiana*) aplicados en campo.

Resultados de esporulación

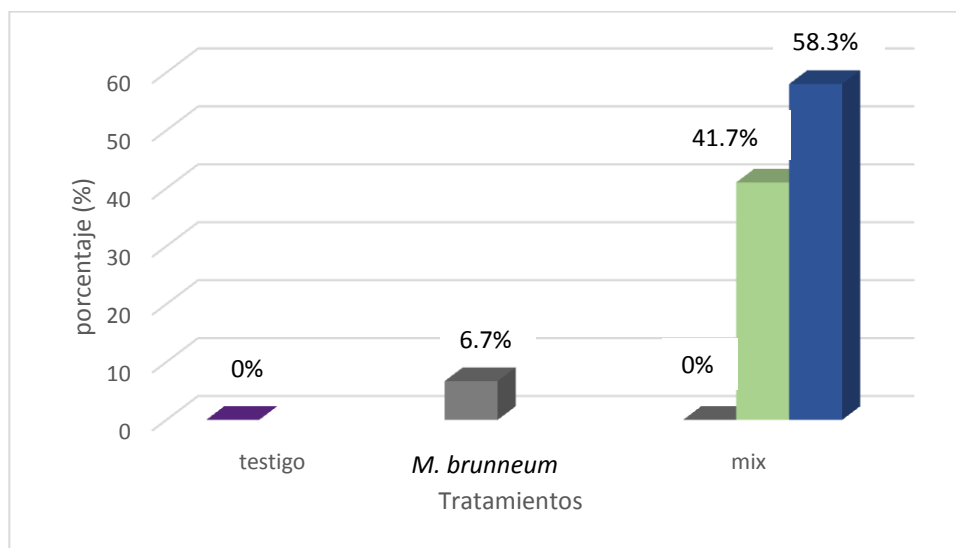


Figura 12. Porcentaje de esporulación de *Metarhizium brunneum* y tratamiento combinado Mix: *Metarhizium Brunneum* (barra gris), *Isaria fumosorosea* (barra verde), *Beauveria bassiana* (barra azul) sobre *Diaphorina citri*.

Los porcentajes de esporulación de *M. brunneum* difirieron en los diferentes tratamientos. En el primer tratamiento (*M. brunneum*) se obtuvo el 6.7% de esporulación en comparación con el Mix de entomopatógenos (*M. brunneum*, *I. fumosorosea* y *B. bassiana*) donde no se observó esporulación por parte de *M. brunneum* (0%). Sin embargo dentro de la mezcla de entomopatógenos, el hongo que predominó en esporular fue *Beauveria bassiana* con 58.3%, le siguió *Isaria fumosorosea* con 41.7% (Figuras 13 y 14).

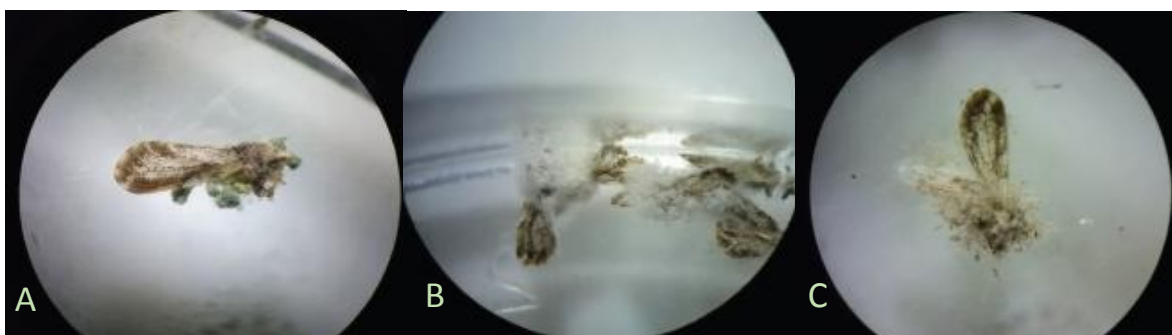


Figura 13. Psílicos con los entomopatógenos esporulados, A: *Metarhizium brunneum* (obtenida del tratamiento de *Metarhizium brunneum*); B: *Beauveria bassiana* (obtenida del tratamiento combinado); C: *Isaria fumosorosea* (obtenida del tratamiento combinado).

Análisis estadístico

Cuadro 7. Datos ya transformados, mediante arcoseno, para ajustar la distribución normal, con 13 repeticiones en cada tratamiento.

	ARCSINE												
Testigo (Agua)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. brunneum</i>	0.00	0.00	0.73	0.68	0.00	0.36	0.59	0.27	1.57	0.56	1.15	1.57	0.63
Mix	0.00	1.23	0.73	0.63	0.82	0.36	0.52	1.57	0.00	0.72	0.91	0.50	1.20

En el Análisis de Varianza solo se analizaron el tratamiento con *M. brunneum* y el Mix (*M. brunneum*, *I. fumosorosea* y *B. bassiana*) pues el testigo

en la corrección con arcoseno (ARCSINE) dio como resultado 0, y la prueba de ANOVA no puede analizar este tipo de datos, entonces solo comparamos los tratamientos que nos dieron cantidades, las cuales podemos comparar, en este caso la transformación es seno de $\sqrt{X + 0.5}$.

Cuadro 8. Análisis de varianza de la variable de mortalidad de *Diaphorina citri* en brotes de *Citrus sinensis* var. Valencia.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0.045	1	0.045	0.18	0.675
Intra-grupos	5.969	24	0.249		

FV= Fuente de Variación, GL= Grados de libertad, SC= Suma de cuadrados, F=F calculada.

Muestra el diseño estadístico realizado en el bioensayo de campo, nos da una significancia de 0.675 el cual está por encima de 0.05; en conclusión, no hay diferencia significativa entre el tratamiento con *M. brunneum* sólo y el tratamiento de tres entomopatógenos (*M. brunneum*, *I. fumosorosea* y *B. bassiana*), puesto que no comparamos al testigo (agua + bionex). Esto muestra que los dos tratamientos se comportan de igual forma en lo que a la variable dependiente se refiere (cuadro 8).

Bioensayo 2. Confrontación de hongos entomopatógenos en medio artificial (PDA).

Cuadro 9. Promedio de crecimiento final radial de *Metarhizium brunneum* por repetición, medidas hechas al radio que formo el micelio del hongo.

Promedio de crecimiento diario de <i>Metarhizium brunneum</i>												
repeticiones	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12
Metarhizium Control	1.1	1.7	2.18	1.5	1.8	2.1	2.2	1.6	1.6	2.1	2.2	2.1
Metarhizium vs Isaria	0.7	0.4	1.10	1.0	0.7	1.1	0.8	0.8	1.0	1.2	0.8	1.0
Metarhizium vs Beauveria	0.77	0.8	0.76	1.56	1.55	1.17	0.83	1.0	0.9	1.2	0.9	0.9

En la figura 15 se presentan los resultados de confrontación en los diferentes tratamientos. Para cada tratamiento se obtuvo el promedio final y se expresa en centímetros.

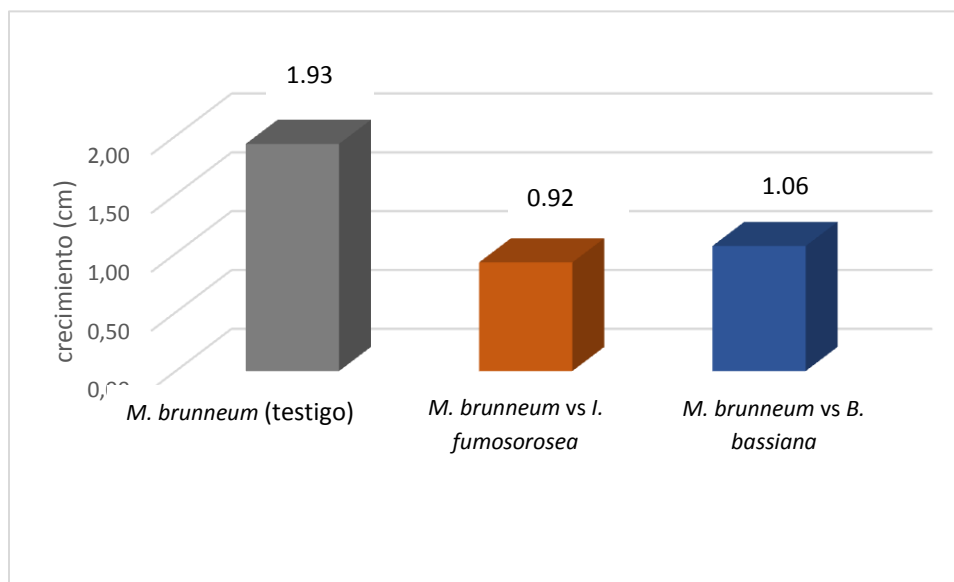


Figura 14. Promedios finales de crecimiento de *Metarhizium brunneum* en presencia de *Isaria fumosorosea* y *Beauveria bassiana*.

El crecimiento radial del micelio de *M. brunneum* en las cajas Petri en el promedio final obtuvo un crecimiento de 1.93cm, mientras que el crecimiento radial entre la combinación de *M. brunneum* en presencia de *B. bassiana* fue de 1.06cm teniendo un crecimiento moderado, sin embargo, el crecimiento de *M. brunneum* combinado con *I. fumosorosea* fue el menor con 0.92cm.

Los entomopatógenos *I. fumosorosea* y *B. bassiana* obtuvieron un crecimiento más constante en presencia de *M. brunneum*, por lo cual se puede asumir una inhibición de ambos hongos hacia *M. brunneum*, siendo más fuerte la de *I. fumosorosea* hacia *M. brunneum*.

Cuadro 10. Raíces cuadradas obtenidas de los promedios finales de los hongos, con 13 repeticiones en cada tratamiento.

Repeticiones	RAIZ CUADRADA												
<i>M. brunneum</i> Control	1.31	1.31	1.48	1.26	1.37	1.46	1.51	1.27	1.28	1.46	1.49	1.45	1.39
<i>M. brunneum</i> vs <i>I. fumosorosea</i>	0.85	0.67	1.05	1.02	0.89	1.09	0.92	0.90	1.01	1.10	0.94	1.02	0.96
<i>M. brunneum</i> vs <i>B. bassiana</i>	0.88	0.93	0.87	1.25	1.25	1.08	0.91	1.02	0.97	1.13	1.00	0.99	1.03

Cuadro 11. Análisis de varianza del crecimiento micelial de *Metarhizium brunneum* en confrontación con *Isaria fumosorosea* y *Beauveria bassiana*.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	7.184	2	3.592	55.336	0
Intra-grupos	2.142	33	0.065		
Total	9.326	35			

De acuerdo al análisis de varianza (cuadro 11) es altamente significativo, los datos muestran heterogeneidad entre los tratamientos, por lo cual podemos asumir que si hay un efecto cuando *M. brunneum* crece en presencia de otros entomopatógenos. Para conocer en que niveles se da esa diferencia entre grupos, se hizo una separación de medias de Tukey.

Cuadro 12. Medias de crecimiento de *M. brunneum*, e intervalos de confianza a 95% en las confrontaciones con diferentes hongos.

repeticiones				
Tukey	tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
	<i>Meta VsIsaia</i>	12	0.9242	
	<i>Mate VsBeuav</i>	12	1.0625	
	<i>Metarhizium</i>	12		1.9333
	Sig.		0.389	1

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12.000.

En esta prueba de Tukey se separaron y formaron 2 grupos, que va de menor a mayor, en el primer grupo que tuvo el menor crecimiento de *M. brunneum* tenemos las dos combinaciones las cuales son *M. brunneum* vs *I. fumosorosea* y *M. brunneum* vs *B. bassiana* con 0.92cm y 1.06cm respectivamente, las cuales no tienen diferencia significativa en su crecimiento y en el grupo 2 en la cual solo esta *M. brunneum* por lo cual obtuvo el mayor crecimiento con 1.9 cm de radio.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se usó una metodología para evaluar la virulencia de *M. brunneum* y un Mix (*M. brunneum*, *I. fumosorosea* y *B. bassiana*) sobre el adulto de *Diaphorina citri* mediante el método de aspersión a una concentración de 1.6×10^8 y 1.4×10^8 conidios mL⁻¹ respectivamente. Los resultados obtenidos fueron 35% y 45% de mortalidad respectivamente, lo que indica una susceptibilidad moderada del psílido en su estadio adulto a la infección por hongos entomopatógenos usando esta metodología. Esto se puede comparar con lo reportado por Padulla y Alves (2009), quienes obtuvieron mortalidades en un rango de 54-72% con cepas de *B. bassiana*, a una concentración de 5×10^7 conidios mL⁻¹. Mellín-Rosas et al. (2009) quienes evaluaron cepas de *I. fumosorosea*, *Metarhizium brunneum* y *B. bassiana* a una concentración de 1×10^7 conidios mL⁻¹, reportan mortalidades de hasta 90, 79.4, y 30.4%, respectivamente y Casique-Valdés (2010) reporta porcentajes de infección de 40-60% al aplicar la misma cepa de *M. brunneum* contra ninfas de *D. citri* lo cual coincide con la mortalidad obtenida.

Estos resultados muestran que un solo bioensayo en particular no puede ser usado como medida universal de virulencia (Grewal et al. 1994), debido a la variación que puede existir entre aislamientos de hongos entomopatógenos dependiendo del nicho ecológico de donde fueron obtenidos.

En los aislamientos y cepas evaluadas, se observó que no existió una relación directamente proporcional entre los porcentajes de mortalidad de los adultos de *D. citri* y los porcentajes de esporulación sobre ellos, observándose en algunos casos una alta mortalidad de ninfas pero baja o nula esporulación. Diversas razones pueden explicar la reducida esporulación, tales como la temperatura y humedad relativa en el ambiente de incubación, falta de nutrientes o factores esenciales para el desarrollo de los conidios (Gottwald y Tedders 1984, Tanada y Kaya 1993). Otros estudios sugieren que los hongos tienden a inducir mortalidad en menor tiempo cuando crecen a la temperatura óptima para

crecimiento vegetativo (Doberski 1981, Moorhouse et al. 1994), e incluso la rapidez del desarrollo del micelio y por consiguiente la evolución de la infección (Ferron, 1978). La temperatura óptima para el crecimiento de los hongos no necesariamente es la misma que para infectar a los insectos (Ferron 1978, Fargues et al. 1992).

Diaphorina citri además de ser susceptible a la infección por diversos géneros de hongos entomopatógenos, está sujeto a varios agentes de control biológico en toda su distribución geográfica, principalmente por varios tipos de depredadores y parasitoides (Hall, 2008); por lo tanto es importante realizar pruebas de inocuidad a insectos no blanco para determinar los efectos de las diferentes especies de hongos que pudieran tener potencial para el control del psílido sobre estos insectos benéficos.

El segundo bioensayo muestra la interacción que tiene *M. brunneum* con *I. fumosorosea* y *B. bassiana* sembrando explantes en una misma caja Petri. El entomopatógeno *M. brunneum* creciendo solo, tuvo un crecimiento promedio final de 1.93 cm, que fue un crecimiento más alto en comparación con el crecimiento junto a *I. fumosorosea* y *B. bassiana* que tuvieron un crecimiento promedio final de 0.92 cm y 1.06 cm respectivamente. Podría darse una inhibición por parte de los entomopatógenos acompañantes, que podrían producir alguna toxina como lo dice Roberts (1981) y Samson et al (1988) que algunos grupos de hongos entomopatógenos son generalmente considerados como patógenos oportunistas que infectan muchas especies de insectos y pueden desarrollarse más rápidamente que otros entomopatógenos, esto se asocia con la producción de toxinas en cada anfitrión.

El estudio de hongos entomopatógenos abre un camino hacia el control de plagas más amigable con el ambiente, para ello tenemos que conocer las interacciones que tienen, en diferentes ambientes, hospederos, y obtener un control similar a un control convencional.

CONCLUSIONES

La mortalidad del psílido asiático por *M. brunneum* (37%) es relativamente baja en comparación con el tratamiento al que se combinó con los dos hongos (44%) esto pudo depender de la baja humedad relativa que prevaleció en aquellos días. En la combinación *M. brunneum* obtuvo 0% de insectos micosados lo cual se asume que no obtuvo mortalidad por parte de este hongo, los hongos *I. fumosorosea* con 41.7% de insectos micosados y *B. bassiana* con 58.3% quienes obtuvieron en cuestión de esporulación la más alta y por ende en mortalidad. Por lo que para un control biológico eficiente o para el uso en una campaña contra el psílido, *M. brunneum* no es una buena opción, podemos utilizar los otros dos hongos, o se puede aplicar solo *M. brunneum* para tener una buena respuesta.

Para el segundo bioensayo se llegó a la conclusión que no es recomendable combinar a *M. brunneum* con otros entomopatógenos pues será menos eficiente, aunque *I. fumosorosea* y *B. bassiana* pudieran tener buen efecto combinados, para un control eficiente del psílido asiático de los cítricos, pero hacen falta más investigaciones en esta área para dar datos más precisos.

LITERATURA CITADA

- Alemán, J., H. Baños, y Ravelo, J. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad Huanglongbing una combinación destructiva para la producción citrícola. Rev. Protección Vegetal. 22. 3. 154-165.
- Alves S. B. 1998. Control microbiano de insectos. Brasiia, Editora Manole, 1998. Fungus entomopatogeneticos, pp 289-381. In: Alves SB. (Ed.) 78: 45-48.
- Alves, S.B., y Pereira, R.M. (1989). Produccion of *Metarhizium brunneum* Petch. 85: 69-71.
- Aubert, B. 1987. *Trioza erythrae* del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. Fruits. 42: 149-162.
- Beattie, G. A. C. 2008. Proc. Int. Res. Conf. Huanglongbing, Orlando FL, pp. 25-57.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A. y Humber, R. A. 2009. Una filogenia del linaje *Metarhizium anisoplea*. Mycologia 101: 512-530.
- Bruck, DJ. 2005. Ecología de *Metarhizium brunneum* en medios de comunicación para macetas sin suelo y la rizosfera: implicaciones para el manejo de plagas. Biol. Control. 32: 155-163.
- Bruck, D. J. 2009. Impacto de fungicidas en *Metarhizium brunneum* en la rizosfera del suelo e in vitro. Biol. Control. 54: 597-606.
- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Journal of Plant Pathology. 88 (1) 7-37.
- Casique, V. R. 2010. Evaluación de hongos entomopatógenos y sus formulaciones contra el Psilido Asiático de los Citricos, *Diaphorina citri* Kuwayama. Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo Coahuila, México.
- Da Graca, J. V. 1991. Citrus greening disease. Annual. Rev. Phytopathology. 29: 109- 136.
- Da Graca, J. V., y L. Korsten. 2004. Citrus huanglongbing: Review, present status and future strategies, pp. 229-245. In: S.A.M.H. Naqvi (ed.) Diseases of fruits and vegetables, Vol. 1. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.

- Da Craça, J. V. 2008. Biology, History and World Status of Huanglongbing. Memorias del Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el Psílido asiático de los cítricos. Hermosillo, Son.
- Da Graca, J. V. 2010. Etiology, History and World Situation of Citrus Huanglongbing. 2º Taller Internacional sobre el huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos. Mérida Yucatán, México.
- Fargues, J., N. K. Maniania, J. C. Delmas, y Smits N. 1992. Influence de la temperature sur la croissance *in vitro* d'hyphomycètes entomopathogènes. Agronomie. 12: 557-564.
- Faria, M. R. y Wraight, S. P. 2007. Mycoinsecticides y Mycoacaricides: Una lista completa con una cobertura mundial y la clasificación internacional de tipos de formulación. Biol. Controlar. 43: 237-256.
- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomopathogenous fungi. Annu. Rev. Entomol. 23: 409-442.
- French, J., C. J. Kahlke y Da Graca, J. V. 2001. First record of the Asian Citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), in Texas. Subtropical Plant Science 53: 14-15.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveria-Neto, P. L. Carvalho, G. C. de Batista, E. Berti Filho, J. R. P. Parra, R. A. Zucchi, S. B. Alves y J.D. Vendramin. 1988. Manual de entomología agrícola. 2 edición. Ceres Ltda., Sao Paulo.
- Grewal, P. S., Lewis E. E, R. Gaugler R, y Campbell J. F. 1994. Host finding behavior as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. Parasitology 108: 207-215.
- González-Mora, J., Vallespi C., Dima C.S. y Ehsani R. 2010. HLB Detection Using Hyperspectral Radiometry. 10th International Conference on Precision Agriculture. Jul 18 – 21, 2010.
- Gottwald, T. R., y Tedders W. L. 1984. Colonization transmission and longevity of *Beauveria bassiana* and *Metharhizium brunneum* (Deuteromycotina: Hypomycetes) on pecan weevil larvae (Coleoptera: Curculionidae) in the soil. Environ. Entomol. 13: 557-560.
- Gottwald, T. R., Da Graça, J. V., y Bassanezi, R. B. 2007. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2007-0906-01-RV.

- Hajek, A. E., Leger, R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annual Review of Entomology* 39:293:32.
- Halbert, S. E. 1999. Asian citrus psyllid- A serious exotic pest of Florida citrus. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, University of Florida. 433-437.
- Halbert, S. E. y Manjunath K. L. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorhyncha:Psyllidae) and greening disease of citrus a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87: 330-353.
- Halbert, S.E. y Nuñez C. A. 2004. Distribution of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Lividae) in the Caribbean Basin. *Florida Entomologist*. 87(3): 401-402.
- Hall, D. G. 2008. Biological control of *Diaphorina citri*, pp. 1-7 In: Resúmenes del I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (Candidatus Liberibacter spp.) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria SAGARPA y Organización Norteamericana de Protección a las Plantas. Hermosillo, Sonora, México.
- Hu, G., y Leger R. A. 2002. Los estudios de campo utilizando un mycoinsecticide recombinante (*Metarhizium anisopliae*) ponen de manifiesto que se trata de la rizosfera competente. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6383-6387.
- Jagoueix, S., Bové J. M. y Garnier M. 1996. PCR detection of the two „Candidatus“ liberobacter species associated with greening disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes*. 10:43-50.
- Leucona, R 1996. Microorganismos patógenos empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. Buenos Aires. 338p.
- Liu, Y.H., y Tsai J.H. 2000. Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Ann. Applied Biol.* 137: 201-216.
- López-Arroyo, J.I., Peña M.A. y Loera J. 2005. Ocurrencia en México del psílido asiático *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), pp. C68. En: Memorias del VII Congreso Internacional de Fitopatología. Chihuahua, Chih., Méx.
- Martínez-Carrillo, J. L., y Cortez-Mondaca J. 2008. El psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* amenaza la producción citrícola de México. Memoria del XI Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas. UABC.

- Mead, F. 1977. The Asiatic Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). Fla. Dept. Agric y Consumer Serv. Division of Plant Industry. Entomo Circular No. 180. 4p.
- Mellín-Rosas, M. A., Sánchez-González J. A., Fabela-Rojas G., Cruz-Ávalos A. M., y Arredondo-Bernal H. C. 2009. Selección de cepas de hongos entomopatógenos como agentes de control microbiano de ninfas y adultos de *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), pp. 410-415. In R. Zapata-Mata, W. M. Contreras-Sánchez, A. A. Granados-Berber, y S. L. Arriaga-Weiss [eds.], Memorias del XXXII Congreso Nacional de Control Biológico. Villahermosa, Tabasco, México.
- Meyling, N. y Eilenberg, J. 2007. Ecología de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en agroecosistemas templados: El potencial de control biológico por conservación. Biol. Control 43: 145-155.
- Padulla, L. F. L., y Alves S. B. 2009. Suscetibilidad de ninfas de *Diaphorina citri* a hongos entomopatogenicos. Arquivos do Instituto Biologico, São Paulo. 76: 297-302.
- Reyes, M. R. 2006. El psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), nueva plaga del limón pérsico *Citrus latifolia* Tanaka en El Salvador. MAG- FRUTALES. El Salvador. p. 20.
- Roberts, D. R. 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. In: Burges HD (ed) Microbial control of pests and diseases, 1970–1980. Academic Press, London, pp 441–464
- Samson, R. A., Evans H. C. y Latgé J. P. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Sánchez-Peña, S.R., Casique-Valdez, R., Sánchez-Lara B. M., Ek-Mass, J.N., Hernandez-Guerra, C., Cuerti-Diaz, S. A., Loredó-Salazar, X., López-Arroyo, J. I. 2011. Aplicación en campo de hongos entomopatógenos para el control de *Diaphorina citri* en Martínez de la Torre, Veracruz, México. Memoria segundo Simposium para el manejo del Psílido asiático de los cítricos y el huanglongbing en México. 245-346 pp. México.
- Tanada, Y., y Kaya, H. K. 1993. Patología de Insectos, Academic Press, San Diego, CA. USA: 666p.
- Tsai, J.H. y Ying, H. L. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. J. Economic Entomology 93(6): 1721-1725.

Vaccaro, N.C. 1994. Comportamiento y difusión de la chicharrita de los cítricos *Diaphorina citri* (Homoptera-Doaphoridae) en la zona citrícola de Entre Ríos. En: Carpeta de información citrícola. Vol 2. Sección G (27). EEA INTA Concordia, Entrwe Ríos. 3 pp.