

**EVALUACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y SUS FORMULACIONES
CONTRA EL PSÍLIDO ASIÁTICO DE LOS CÍTRICOS *Diaphorina citri*
(KWAYAMA)**

REBECA CASIQUE VALDÉS

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Octubre de 2011

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO**

**EVALUACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y SUS FORMULACIONES
CONTRA EL PSÍLIDO ASIÁTICO DE LOS CÍTRICOS *Diaphorina citri* (KUWAYAMA)**

**TESIS
PRESENTADA POR:
REBECA CASIQUE VALDÉS**

**Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como requisito
parcial para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal

_____ **DR. SERGIO RENÉ SÁNCHEZ PEÑA**

Asesor

_____ **DR. GUSTAVO FRÍAS TREVIÑO**

Asesor

_____ **DR. MELCHOR CEPEDA SILLER**

Asesor

_____ **DR. ISABEL LÓPEZ ARROYO**

DR. FERNANDO RUÍZ ZARATE

Subdirector de Posgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Octubre de 2011

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios, por guiarme y cuidarme en todo momento y quien hizo posible que una etapa más concluyera a lo largo de mi carrera.

Agradezco en particular a mi madre, por su amor y porque siempre estuvo motivándome y apoyando sin condición alguna a pesar del tiempo que no estuve a su lado.

A mi padre por sus consejos y opiniones que siempre me guiaron en todo momento.

Gracias a mi esposo, por tu amor y comprensión, por estar conmigo en los momentos más felices de mi vida y apoyarme a lo que me proponga siempre tomados de la mano.

A mi hermana con mucho cariño por su gran amistad y por los momentos que hemos compartido.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología porque me ayudaron con mi formación profesional e hicieron posible la realización del proyecto.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, la cual me brindó un valioso aprendizaje a través de sus profesores y alumnos; además de acogerme en el tiempo que estuve ahí.

Gracias al Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, y al Dr. Ernesto Cerna quién me apoyó en la estancia que surgió del proyecto realizado.

Agradezco al Dr. Sergio René Sánchez Peña el tiempo que invirtió en mi formación, sus enseñanzas y principalmente su actitud desinteresada al guiarme en todo momento.

No puedo olvidar a Cristina Sánchez Flores con la cual he compartido incontables horas de trabajo. Gracias por los buenos momentos, por tu alegría y tu paciencia, por tu esfuerzo y siempre tu participación desinteresada de la cual aprendí mucho.

Ivonne, Yuliana, Julio, Braulio y Anita muchísimas gracias por su ayuda, su apoyo y el tiempo que estuvieron a mi lado, sin ustedes, no hubiese sido posible finalizar este trabajo y principalmente por la amistad que surgió en las horas de trabajo.

Al Dr. Isabel López Arroyo y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, por sus sugerencias e ideas de las que tanto provecho he obtenido.

Un sincero agradecimiento al Dr. Gustavo Frías y al Dr. Melchor Cepeda Siller, por su participación en el cuerpo de asesores y principalmente sus enseñanzas que nunca olvidaré.

Gracias al Dr. Michael Bidochka. Por sus instrucciones y su apoyo en la estancia fuera de mis seres queridos. Aprendí mucho de él y de su equipo de trabajo.

Gracias a toda mi familia y amigos, por su apoyo principalmente y ayudarme en los momentos más difíciles, nunca olvidaré el tiempo que pasamos juntos y lo más importante, la amistad que día a día se hace más fuerte.

Dedicatoria

**A mi esposo, por su cariño y paciencia,
y ser el motor que me impulsa día con día.**

A mi familia por su gran apoyo y soporte.

COMPENDIO

**EVALUACION DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS Y SUS FORMULACIONES
CONTRA EL PSILIDO ASIATICO DE LOS CITRICOS *Diaphorina citri*
(KUWAYAMA)**

POR:

REBECA CASIQUE VALDES

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGIA AGRICOLA
UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COHAUILA. OCTUBRE DE 2011.**

Dr. Sergio René Sánchez Peña -Asesor-

Palabras clave: *Diaphorina citri*, Hongos entomopatógenos, formulaciones, HLB.

El Huanglongbing es una enfermedad de reciente introducción a México transmitida por el psílido Asiático de los cítricos *Diaphorina citri* la cual no tiene cura y los árboles infectados mueren en el transcurso de algunos años. Debido a los efectos nocivos que provocan los insecticidas, el control del vector con hongos entomopatógenos (HE) puede

ser una alternativa eficaz para atacar el problema; para ello, se aislaron cepas de HE de suelo de la zona citrícola de Nuevo León y Tamaulipas, México y de psílicos micosados de *D. citri*, éstos últimos se identificaron con Primers de la subunidad ribosomal D1D2. La efectividad de 46 cepas y blastosporas de HE en la mortalidad de ninfas y adultos de *D. citri* se evaluó a 1×10^7 esporas/ml en Tween 20 a 0.025% (T20). Aceite mineral agrícola en emulsión con agua y T20 se probaron en aplicaciones de HE en una huerta de naranjos en Martínez de la Torre Veracruz, México, la infección por HE se evaluó en ninfas de *D. citri* después de 72 horas de exposición en campo con %HR bajo y altas temperaturas. 11 cepas de *Beauveria bassiana* y 16 de *Metarhizium anisopliae* se aislaron de suelo; 5 *Hirsutella citriformis*, 4 *Lecanicillium lecanii*, 2 *Torrubiella* spp y 10 *Isaria fumosorosea* de psílicos micosados. El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre la mortalidad de ninfas de *D. citri* evaluando 46 cepas de HE y el testigo. Las mejores cepas infectivas fueron de *B. bassiana* (B6C, B5C), *M. anisopliae* (3M8, 6M11) e *I. fumosorosea* (IF8B19) presentando >90% de mortalidad. No hay diferencia significativa en % de infección en ninfas inducido por cepas B6C, 6M11, IF8B19 en campo, pero si diferencia altamente significativa respecto al testigo ($P=4.2 \times 10^{-10}$), en la interacción hongo-formulación se aprecian diferencias significativas ($P=0.04167$). B6C como factor, indujo más del 69% de infección en ninfas; IF8B19 trabajó mejor con T20 (60%) que en aceite (31%); B6C indujo los valores más altos de infección de más del 80% aplicado en emulsión de aceite en agua. De acuerdo a los resultados, la aplicación de HE en formulaciones es una alternativa prometedora de control biológico de *D. citri*.

ABSTRACT

EVALUATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AND FORMULATIONS AGAINST THE ASIAN CITRUS PSYLLID *Diaphorina citri* (KUWAYAMA)

BY

REBECA CASIQUE VALDES

MASTER OF SCIENCES IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. OCTOBER, 2011.

Dr. Sergio René Sánchez Peña -Asesor-

Key Words: *Diaphorina citri*, entomopathogenic fungi, formulations, HLB.

The Huanglongbing is a disease recently introduced to Mexico transmitted by the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* which has no cure, and infected trees die within a few years. Due to the adverse effects caused by insecticides, vector control with entomopathogenic fungi (EF) can be an effective alternative to combat the problem. For this, we isolated EF strains from soil of the citrus area of Nuevo Leon and Tamaulipas,

Mexico and from mycosed psyllids of *D. citri* these were identified using primers of the ribosomal subunit D1D2. The effectiveness of 46 strains and blastospores of EF in the mortality of nymphs and adults of *D. citri* was evaluated at 1×10^7 spores/ml in 0.025% Tween 20 (T20). Agricultural mineral oil in water emulsion and T20 were tested in applications of EF in an orchard of orange trees in Martinez de la Torre Veracruz, Mexico; EF infection was evaluated in nymphs of *D. citri* after 72 hours of exposure in the field with % RH low and high temperatures. 11 strains of *Beauveria bassiana* and 16 of *Metarhizium anisopliae* were isolated from soil and 5 *Hirsutella citriformis*, 4 *Lecanicillium lecanii*, 2 *Torrubiella* spp., 10 *Isaria fumosorosea* from mycosed psyllids. The analysis of variance showed highly significant differences between the mortality of nymphs of *D. citri* of 46 evaluated strains of EF and the control. The best infective strains were *B. bassiana* (B6C, B5C), *M. anisopliae* (3M8, 6M11) and *I. fumosorosea* (IF8B19) presenting > 90% mortality. No significant differences in % of infection in nymphs induced by strains B6C, 6M11, IF8B19 in the field, but highly significant difference compared with the control ($P=4.2 \times 10^{-10}$), in the fungus-formulation interaction are significant differences ($P=0.04167$). B6C as factor, induced more than 69% infection in nymphs; IF8B19 worked better with T20 (60%) than oil (31%) B6C induced the highest values of infection (more than 80%) in oil emulsion water. According to the results, the application of EF in formulations is a promising alternative for biological control of *D. citri*.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
Objetivo general	2
Objetivos específicos.....	3
HIPOTESIS	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
El Psílido Asiático de los Cítricos <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama	4
Clasificación taxonómica.	4
Morfología	5
Adultos.....	5
Ninfas.....	6
Huevos	7
Ciclo de vida y biología de <i>Diaphorina citri</i>	8
Distribución geográfica de <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama	9
Importancia de <i>Diaphorina citri</i> en la citricultura Mexicana	10
Distribución e Importancia de HLB en México y el mundo.	12
Presencia de HLB en México.....	13
Síntomas de HLB	14
Diagnóstico de HLB.....	15
Transmisión y propagación de la bacteria.....	16
Métodos de control para el psílido asiático de los cítricos <i>Diaphorina citri</i>	16

Control químico.....	17
Control biológico.....	18
Depredadores.....	18
Parasitoides.....	20
Hongos entomopatógenos	21
Biología y clasificación de los hongos entomopatógenos	24
Proceso de infección de hongos entomopatógenos	28
Formulación de Hongos entomopatógenos.....	30
III. ARTÍCULO 1. PATHOGENICITY OF <i>Hirsutella citriformis</i> (Ascomycota: Cordycipitaceae) TO <i>Diaphorina citri</i> (HEMIPTERA: PSYLLIDAE) AND <i>Bactericera cockerelli</i> (HEMIPTERA: TRIOZIDAE).....	35
IV. ARTICULO 2. Field applications of entomopathogenic fungi for the control of the Asian Citrus Psyllid <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama in a citrus orchard in Mexico...	44
V. CONCLUSIONES	71
VI. LITERATURA REVISADA.....	74

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Psílido asiático de los cítricos, <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama es su postura característica.....	5
Fig. 2. Estadios ninfales de <i>Diaphorina citri</i>.....	7
Fig. 3 Huevos del psílido asiático de los cítricos <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama.....	7
Fig. 4. Distribución mundial de <i>Diaphorina citri</i>.....	10

Fig. 5. Distribución de Huanglongbing (HLB) en México.....	14
Fig. 6. Síntomas de HLB en hojas y frutos.....	15
Fig. 7. Depredador <i>Olla v-nigrum</i> (Coeloptera: Coccinellidae) de <i>Diaphorina citri</i> muy común en México.....	19
Fig. 8. Avispa <i>Tamarixia radiata</i> (Hymenoptera: Eulophidae) en ninfas de <i>D. citri</i>.....	21
Fig. 9. Hongos entomopatógenos infectando al psílido asiático de los cítricos <i>Diaphorina citri</i>.....	23
Fig. 10. Estructura y composición de la cutícula del insecto y esquema de la penetración por hongos entomopatógenos.....	28
Fig. 11. Conidias de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre la cutícula de un insecto y formando apresorio.....	29

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de hongos entomopatógenos.....	27
Cuadro 2. Tipos y descripción de las principales formulaciones.....	33

I. INTRODUCCIÓN

El psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) es vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. causante de la enfermedad más destructiva de los cítricos, el Huanglongbing (HLB), la cual amenaza las 512 mil hectáreas establecidas con este cultivo, distribuidas en 23 Estados del territorio Mexicano (Dirección General de Fomento a la Agricultura, 2007). El HLB causa bajo rendimiento en calidad y producción de los frutos (Marutani *et al.*, 2009) y una vez el árbol infectado, muere en poco tiempo (Gottwald *et al.*, 2007). Esta enfermedad ha afectado de manera devastadora zonas cítricas en Arabia Saudita donde desaparecieron todas las plantaciones de naranja dulce y mandarina en solo diez años; las pérdidas anuales en Sudáfrica son del 30 al 100% de la producción, mientras que en otras zonas de África y Asia, la severidad de la enfermedad es responsable de la reducción significativa de las áreas destinadas a los cítricos (Coelho y Marques, 2002; Hung *et al.*, 2004).

En el Diciembre de 2009, SENASICA, publicó un comunicado oficial donde indica la llegada del HLB a Mérida Yucatán, la cual gradualmente ha invadido los estados de Quintana Roo, Nayarit, Jalisco, Campeche, Colima, Sinaloa, Michoacán y recientemente Chiapas y Baja California, en los cuales se tiene implementado las disposiciones fitosanitarias especificadas en el acuerdo de plagas cuarentenarias de los cítricos Huanglongbing (HLB) ante la emergencia de detección y erradicación de plantas enfermas con HLB (SENASICA, 2011).

Debido al uso indiscriminado de insecticidas y al costo en el manejo de éstos, el uso de hongos entomopatógenos, puede ser una alternativa eficaz para retrasar el ingreso del HLB a las áreas productoras en donde está presente el insecto. Los intentos de control biológico con parasitoides no han logrado reducir las poblaciones del psílido de manera significativa (Baeza, 2008) y la alternativa de manejo, el control químico, causa disturbios ecológicos que inducen el incremento explosivo de plagas que normalmente están reprimidas por agentes de control biológico como es el caso de la mosca prieta de los cítricos *Aleurocanthus woglumi* (Cano y Swezey, 1992; Varela *et al.*, 2006) Es por esto que se busca generar una técnica amigable y viable que puede impedir el avance del HLB y evitar los cuantiosos daños que causa en las plantas el psílido y la bacteria. El proyecto de investigación tiene como objetivos, aislar e identificar cepas de hongos entomopatógenos nativas de Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas, evaluar tanto su efectividad para matar al psílido como la mejor formulación para su aplicación masiva. Al lograrse estos objetivos, se tendrá una alternativa práctica y ambientalmente segura para manejar el vector del HLB en diferentes estados productores de cítricos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar hongos entomopatógenos del psílido asiático de los cítricos y evaluar su efectividad contra el mismo.

Objetivos específicos

- 1) Aislar e identificar cepas de hongos entomopatógenos nativas de Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas.
- 2) Evaluar en laboratorio la efectividad de hongos entomopatógenos en suspensión acuosa contra *Diaphorina citri* y seleccionar cepa(s) virulentas.
- 3) Evaluar formulaciones en aceite, blastosporas y suspensiones acuosas de las cepa(s) seleccionada(s) para su aplicación en campo.
- 4) Aplicar en campo el hongo entomopatógeno y la(s) formulación(es) seleccionada(s).

HIPOTESIS

Los hongos entomopatógenos aislados de suelo y del psílido *Diaphorina citri*, provocan porcentajes de mortalidad superiores a 80% en laboratorio y 70% en campo sobre *Diaphorina citri*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

El Psílido Asiático de los Cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama

Clasificación taxonómica.

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Suborden: Sternorrhyncha

Superfamilia: Psylloidea

Familia: Psyllidae

Género: *Diaphorina*

Especie: *citri*

Morfología

Adultos

En la literatura aparece que mide de 3-4 mm de longitud (Halbert y Manjunath, 2004) sin embargo Hall (2008), reporta medidas de 2.7 a 3.3 mm de largo con alas café moteadas. Cuerpo marrón jaspeado, recubierto de polvo ceroso, cabeza marrón con ojos rojos. Las antenas presentan el ápice negro con dos manchas marrón claro en la parte media. Las alas son más anchas que el tercio apical. (Cermeli *et al.*, 2000). Se alimentan por el envés de las hojas (Grafton *et al.*, 2006), aunque cuando hay altas poblaciones, se les puede observar formando grupos tanto en el haz como en el envés. Se les puede reconocer por la posición que adoptan durante la alimentación, donde la cabeza está pegada a la superficie de la hoja, mientras que el extremo distal del cuerpo está levantado, formando un ángulo de 30 a 45° con respecto a la superficie (Halbert y Manjunath, 2004).



Fig. 1. Psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama es su postura característica (foto de Michael Rogers, UC)

Ninfas

Las ninfas son de color naranja o verde opaco y se alimentan de las hojas jóvenes y tallos. El primer estadio ninfal es de 0.3 mm de largo y 0.17 mm de ancho con un cuerpo ligeramente rosado y un par de ojos rojos compuestos (Tsai y Liu, 2000). El segundo estadio es de 0,45 mm de largo y 0,25 mm de ancho; son visibles alas rudimentarias en forma de almohadillas en el dorso del tórax. Los promedios del tercer estadio son de 0.74 mm de largo por 0.43 mm de ancho, hay evidencia de segmentación de antena. El promedio del cuarto estadio es de 1.01mm de longitud y 0,7 mm de ancho, cuenta con dos setas en cada antena (Husain y Nath, 1927). El quinto estadio tiene un promedio de 1,6 mm de largo y 1,02 mm de ancho, hay tres setas en cada antena (Husain y Nath, 1927). Cuando las ninfas maduran, algunas tienen el abdomen verde azulado, en otros se vuelve naranja pálido.

Las ninfas se alimentan de las hojas jóvenes y tallos continuamente secretando grandes cantidades de mielecilla por el ano y una sustancia cerosa filiforme de las glándulas circumanales (Tsai y Liu, 2000).



Fig. 2. Estadios ninfales de *Diaphorina citri* (fotografía por David Hall, USDA).

Huevos

El tamaño promedio de un huevo aparece en la literatura de 0.31mm de longitud y 0,14 mm de ancho, alargado y de forma oval (Tsai y Liu, 2000), Los huevos son de color amarillo cuando recién son depositados y se vuelven de color naranja brillante con dos manchitas rojas en los ojos cuando maduran.



Fig. 3. Huevos del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama. (Fotografía por Douglas L. Caldwell, University of Florida)

Ciclo de vida y biología de *Diaphorina citri*

El ciclo de vida del psílido incluye una etapa de huevecillo y cinco estadios de ninfas. El rango óptimo de temperatura para el desarrollo del psílido asiático de los cítricos está entre 25-28°C. Las hembras ponen huevos continuamente durante toda su vida si las hojas jóvenes se encuentran presentes. Se ha observado que las hembras adultas durante su vida ponen 500 a 800 o más huevos durante un periodo de dos meses con un máximo de 1900 (Husain y Nath 1927, Pruthi y Batra 1938, Tsai y Liu 2000, Nava *et al.* 2007). Los huevos eclosionan en 4 días y las ninfas se desarrollan en un período de 13 días hasta llegar a adulto según lo reportado por Tsai y Liu (2000). Los adultos nuevos alcanzan la madurez reproductiva dentro 2 o 3 días y la ovoposición comienza a partir de 1 o 2 días después del apareamiento (Wenninger y Hall 2007, citado por Hall 2008). Las hembras y machos se encuentran unos a otros para aparearse en parte, al sonido de la vibración que transmite el contacto con el sustrato (Wenninger *et al.* 2008).

El tiempo de generación de la media poblacional a 25°C varía de 22 a 25 días; a 24°C los machos adultos, viven un promedio de 21 a 25 días y las hembras de 31 a 32 días (Nava *et al.* 2007). La longevidad máxima osciló según lo reportado por Tsai y Liu (2000) entre 117 días a 15°C a 51 días a 30°C.

La población del psílido fluctúa en relación a la temperatura y la humedad relativa. El psílido aumenta en la población dos veces al año, que coincide con períodos de brotes de los cítricos en primavera y verano (Wang *et al.*, 1996; Sahu & Mandal, 1997).

Distribución geográfica de *Diaphorina citri* Kuwayama

El psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri*, se encuentra ampliamente distribuido en regiones tropicales y subtropicales de Asia, aunque también se encuentra difundida en el continente americano. Se trata de una plaga importante de los cítricos en varios países, en particular en la India, donde ha habido una disminución significativa de los cítricos en los últimos años. En Junio de 1998, el insecto fue detectado en Florida (Estados Unidos) y en Septiembre de 2000, esta plaga se había extendido a 31 condados en el estado (Halbert, 2001).

En México, el psílido se encuentra en todos los estados citrícolas (López, 2008), por lo que desde el año de 2008 en el marco de la Campaña de Prevención de Introducción de Plagas Cuarentenarias de los Cítricos se realizan en el país diferentes acciones como la exploración para detección de síntomas con el propósito de detectar y eliminar oportunamente las plantas infectadas por HLB y evitar la presencia de brotes que contaminen el resto de las plantas.

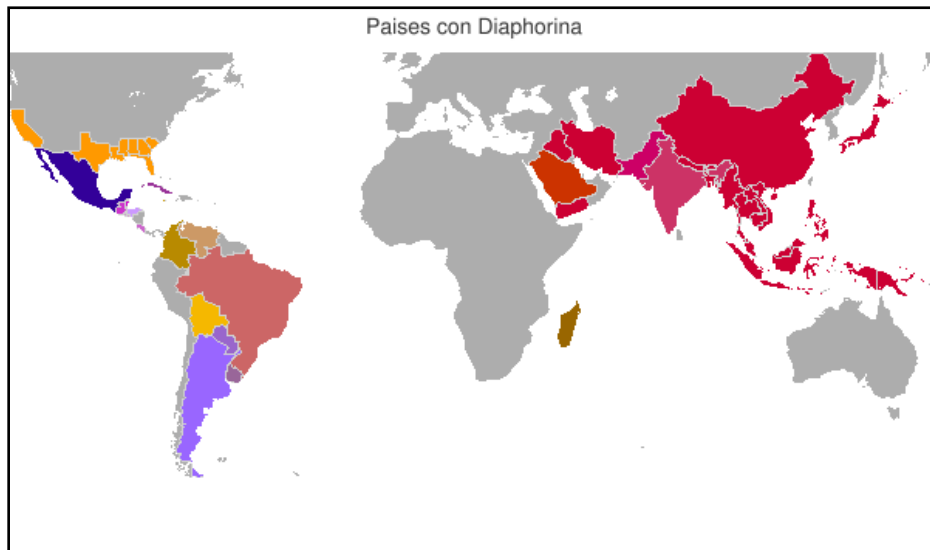


Fig. 4. Distribución mundial de *Diaphorina citri*. de Estados Unidos solo se anotan los estados donde se han reportado e incluye Hawaii, que no aparece en este mapa. Fuentes: Grafton-Cardwell *et al.* 2006. García-Darderes, C.S. 2009. <http://www.invasivespeciesinfo.gov/animals/acp.shtml>.

Importancia de *Diaphorina citri* en la citricultura Mexicana

Como se mencionó, el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: psyllidae) es una plaga importante de los cítricos en el mundo. Es un vector altamente competente de la bacteria habitante del floema *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Marutani *et al.*, 2009) causante de la enfermedad Huanglongbing (HLB); esta enfermedad bacteriana es transmitida a árboles sanos por el psílido después que éste se alimenta de un tejido enfermo; los psílicos extraen cantidades muy grandes de savia de las plantas donde se alimentan y producen cantidades copiosas de mielecilla, la cual cubre las hojas de los

árboles fomentando el crecimiento de fumagina; además, el psílido, mientras se alimenta, inyecta una toxina presente en la saliva que detiene la elongación terminal y causa la malformación de las hojas y brotes (Michaud, 2004). Una sola ninfa del psílido que se alimenta por menos de 24 horas en una hoja de cítrico, causa malformación permanente de esa hoja (Grafton *et al.*, 2006). Dentro del insecto, la bacteria cruza la pared intestinal hasta llegar a las glándulas salivales, vía hemolinfa, tomándose para esto de 1 a 3 semanas según la virulencia de la cepa (Orozco, 1995).

En base a las acciones que se llevan a cabo para la detección oportuna del HLB, se han establecido acciones fitosanitarias para mitigar el riesgo de introducción y su dispersión según la Norma oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-047-FITO-2009, la cual establece que dicha enfermedad representa una seria amenaza para las 526 mil hectáreas de cítricos distribuidas en las 23 entidades federativas productoras. Es importante destacar que el HLB ha causado graves daños en Asia y África ocasionando graves daños a la industria citrícola. En algunas zonas citrícolas de China, Taiwán, Tailandia y Vietnam, se realizan hasta 50 aplicaciones de insecticidas al año para el control del vector, a fin de evitar la dispersión y el daño de la enfermedad. (Alarcón, 2010).

Una vez que un árbol está infectado no tiene cura, la bacteria es de difícil control afectando la vida útil de las plantas tanto jóvenes como adultas de todos los cítricos, incluyendo a sus híbridos (Hall, 2008).

Distribución e Importancia de HLB en México y el mundo.

El HLB es una abreviatura que significa Huanglongbing, palabra de origen chino que significa enfermedad del brote amarillo. El HLB se consideraba restringido a los Continentes asiático y africano, sin embargo, en Febrero del 2004 se detectó en Brasil. En agosto del 2005, la enfermedad fue detectada también en Florida E.U.A. (Bove, *et al.*, 2008); en 2007 se informa de su presencia en Cuba y en el 2009 en México, siete años después de la llegada del psílido al país (Trujillo, 2010). Es una enfermedad que ataca a todas las rutáceas entre ellas, el limón, la naranja, toronja y limonaria (que es su principal hospedero); la enfermedad no tiene cura y los árboles infectados mueren en el transcurso de 5 a 8 años (Halbert y Manjunath, 2004).

El HLB es causado por *Candidatus Liberibacter*, una bacteria gram negativa (Bové, 2006). El HLB se transmite por medio de vectores; existen dos géneros importantes: *Diaphorina citri* en Asia y América y *Trioza erytreae* en Africa. (Aubert, 1987). En México, el vector es *Diaphorina citri*. Otra manera de transmitirse es mediante injerto de yemas infectadas. También se disemina a través del transporte de plantas enfermas; existen tres variantes de esta bacteria, *C. L. asiaticus*, *C.L. africanus* y *C.L. americanus*.

El HLB se considera una de las enfermedades más destructivas para los cítricos en el mundo. El Instituto Nacional de Sanidad Vegetal de Cuba (INISAV, 1999), hace una reseña de los daños ocasionados por este patógeno en diferentes partes del mundo: en Sudáfrica ocasiona pérdidas anuales del 30 al 100% de la producción, en la Isla Reunión y en Tailandia se han reportado plantaciones abandonadas por los estragos que causa el HLB,

en Filipinas, la producción de cítricos disminuyó de 11 mil 700 toneladas a 100 toneladas de 1960 a 1970 por el ataque de este patógeno; lo anterior, debido a que afectó a 7 millones de plantas en esa década; los registros muestran que en 1971 causó la muerte de un millón de árboles en una sola provincia de ese país. En Indonesia, más de 3 millones de plantas fueron afectadas entre 1960 y 1970. En Guandong, China, durante el período comprendido entre 1977 y 1981 fueron erradicadas 960 mil plantas de mandarinas y limones por causa del HLB, lo que disminuyó la producción de la región de 450 mil a 5 mil toneladas. Todas las plantaciones de mandarinas y naranja dulce de Arabia Saudita desaparecieron durante la década de 1975 a 1985.

Presencia de HLB en México

A la fecha (marzo de 2011) el HLB se encuentra en los siguientes estados: Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Chiapas, Campeche, Yucatán, Quintana Roo y Baja California. El mapa (Fig. 2) muestra la distribución de HLB en México.

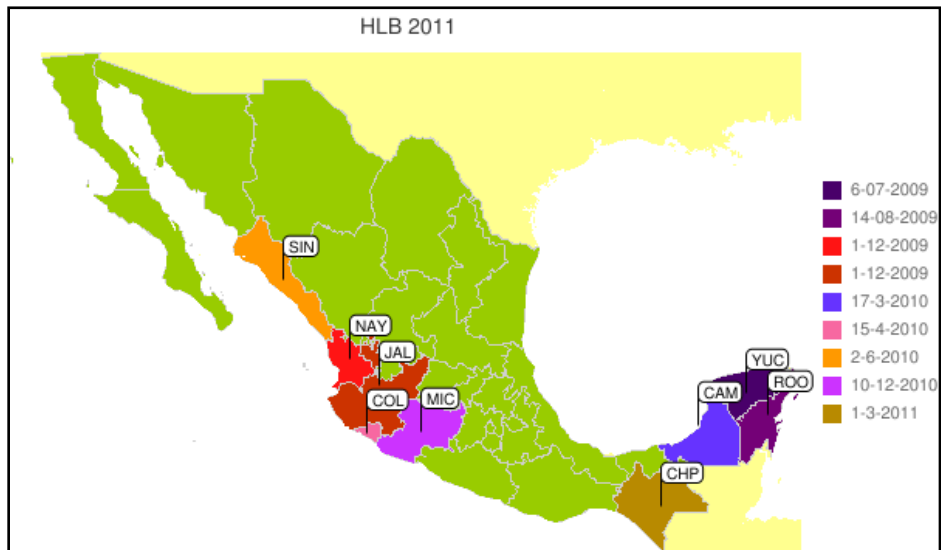


Fig. 5. Distribución de Huanglongbing (HLB) en México. Fuente: SENASICA (consulta: 20-3-2011: <http://www.senasica.gob.mx/?id=2505>)

Síntomas de HLB

Los síntomas del HLB incluye el amarillamiento y clorosis de los brotes así como moteado de las hojas (Capoor *et al.*, 1974); las ramas y brotes mueren y se secan en árboles que tienen una infestación prolongada, el árbol pierde follaje, en el caso de los frutos, su desarrollo se detiene, en algunos casos los frutos se deforman, tienen una coloración atípica y las semillas son abortivas; después de un tiempo, el árbol muere (Gottwald *et al.*, 2007).

Durante la infección se muestran fuertes floraciones con un pobre cuajado de frutos; se presenta la caída prematura de frutos y los que se mantienen en el árbol son pequeños y

asimétricos; también toman la coloración normal solo en la parte expuesta al sol, mientras que la otra parte toma una coloración verde-olivo intenso (Gottwald *et al.*, 2007).

Los frutos poseen una baja cantidad de jugo, además de poca concentración de sólidos solubles y azúcares, por lo que son muy ácidos y no pueden utilizarse en la industria por su sabor amargo-salado y desagradable.



Fig. 6. A) Síntomas en limón, se observa clorosis y amarillamiento difuso. (Fuente: SENASICA (<http://www.senasica.gob.mx/?id=1013>). B) Síntomas de HLB en frutos (Fotografía por: Kiritani, K. and Su HJ. 1999).

Diagnóstico de HLB

El diagnóstico de la enfermedad, requiere de técnicas moleculares; en el pasado, esta bacteria fue extremadamente difícil de detectar y caracterizar. En años recientes, existen pruebas de DNA, microscopía electrónica y pruebas de ELISA que se han desarrollado para mejorar su detección. (Roistacher 1991, Garnier and Bové 1993, Bové *et al.*, 1996).

Transmisión y propagación de la bacteria

La principal vía de transmisión de la bacteria en el campo es mediante el insecto vector. Se ha demostrado en algunos experimentos que un tiempo de alimentación de 5-7 horas es suficiente para adquirir y transmitir el patógeno, mientras que esto no se logra con periodos de 1-3 horas. (Hall, 2008). Por otra parte no se conoce si el psílido es capaz de infectarse simultáneamente con las dos formas de la bacteria. Los adultos y el cuarto y quinto instar son capaces de transmitir el patógeno por vía de secreción salivar después de un periodo de latencia que varía desde 1-25 días. Las ninfas del primer al tercer instar no transmiten el patógeno (Aleman *et al.*, 2007). El patógeno se multiplica en el vector y, por consiguiente, después de adquirir el patógeno, los adultos son infecciosos durante toda su vida (Xu *et al.*, 1988; Hung *et al.*, 2004). Después de la adquisición del patógeno, Moll y Van Vuuren (1977) reporta un período de latencia en adultos recién infectados de 21 días para transmitir el patógeno. Capoor *et al.* (1974) menciona períodos entre 8 y 12 días.

Métodos de control para el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*

Diversos métodos y estrategias de control se han empleado en el mundo para enfrentar, tanto al vector, como a la enfermedad. Estos incluyen la destrucción y eliminación de las fuentes de inóculo, el control del insecto vector y la renovación de las plantaciones utilizando posturas sanas (Chiou-Nan, 1998). En el caso de establecerse el vector y no detectarse la enfermedad, entonces se plantea la implementación de programas

de control biológico (Grafton *et al.*, 2006). En México, se dirigen campañas de Sanidad Vegetal donde se erradican plantas hospederas de *D. citri* (*Murraya paniculata*), se realiza el monitoreo de la enfermedad y diagnóstico temprano de la bacteria con técnicas moleculares y en algunas partes de la república aplicaciones con insecticidas de contacto.

Control químico

El control químico se dirige principalmente hacia el vivero, plantaciones de fomento y plantaciones jóvenes, puesto que los árboles maduros soportan mejor los daños causados por el vector (Alemán *et al.*, 2007).

En Brasil, los insecticidas que han ejercido un buen control sobre el psílido asiático de los cítricos son productos sistémicos en períodos de lluvia y de movimiento de savia como son el Temik y el imidacloprid (Childers y Rogers 2005), entre otros; y productos de contacto en períodos de sequía como son Dimetoato, Ethion, Malathión, Piretroides, Carbamatos y Abamectina. (Cobelo, 2005). En un trabajo realizado en Florida por Childers y Rogers (2005), encontraron que los insecticidas foliares: Actara, Danitol y Lorsban proporcionaron buenos derrumbes y alta residualidad del psílido asiático de los cítricos.

Medidas de control químico como insecticidas (Dimetoato, monocrotofos, fosfamidón, confidor, decametrina, y fenvalerato), productos vegetales (aceite de neem, aceites en aerosol (petróleo)) y reguladores del crecimiento de insectos han sido probados contra el psílido asiático de los cítricos con resultados alentadores (Ahmed *et al.*, 2004). De dos a

tres aspersiones con intervalos de 10 a 15 días se han encontrado ser eficaces contra el psílido asiático de los cítricos (Dahiya et al, 1994; Shivankar *et al.*, 2000).

Muchos insecticidas sintéticos han sido probados contra este psílido, entre los cuales se mencionan endrin, diazinon, parathion, malathion, methyldemeton, thiometon, DDT, dimethoate, phosphamidon, monocrotophos, oxydemeton-methyl, phosalone, quinalphos y phosmet, sin embargo, generalmente se acepta que los aceites de petróleo son más efectivos contra insectos pequeños e inmóviles, los cuales quedan cubiertos por una fina película de aceite y por tanto mueren. Se ha observado que los huevos y las ninfas del psílido presentes en los brotes sufren significativa mortalidad cuando se aplica este tipo de producto, aunque la susceptibilidad a los aceites difiere entre los estados de la plaga, con los instares jóvenes más susceptibles, mientras que los huevos son más tolerantes. Los aceites de petróleo han demostrado un efectivo control de las ninfas del psílido en condiciones de campo y para obtener una mejor protección del cultivo se recomienda su aplicación en intervalos menores de nueve días (Rae *et al.*, 1997).

Control biológico

Depredadores

El psílido es comúnmente atacado por mariquitas (Coleoptera: Coccinellidae); los coccinélidos han sido reportados como agentes biológicos más importantes del control de *D. citri* entre las que destacan *Harmonia axyridis* Pallas, *Olla v-nigrum* Mulsant,

Exochomus childreni Mulsant, *Cycloneda sanguinea* L., *Curinus coeruleus* Mulsant
Coccinella septempunctata L., *C. rependa* Thunberg, *Cheilomenes sexmaculata* Fab.
Chilocorus nigrita (Fab.), *Scymnus* spp. (Husain and Nath 1927, Aubert 1987, Gravena *et al.* 1996, Michaud 2001, Michaud 2002, Michaud 2004, Michaud and Olsen 2004),
Brachiacantha decora e *Hippodamia convergens* (Inifap, 2010); Sírfidos (Diptera: Syrphidae), crisopas (Neuroptera: Chrysopidae, Hemerobiidae) y arañas (Araneae) (Aubert 1987, Michaud 2001, Michaud 2002, Michaud 2004, González *et al.* 2003).

No se han encontrado huevos de *D. citri* parasitados y los adultos parecen estar bastante libres de enemigos naturales (Husain y Nath, 1927).

Algunas especies de arañas pueden ser depredadores importantes de *D. citri* (Michaud 2002, Alghamdi 2000).



Fig. 7. Depredador *Olla v-nigrum* (coeloptera: coccinellidae) muy común en México.
(Fotografía por CNRCB, Colima, México)

Parasitoides

Tamarixia radiata es una especie originaria de la India, que ha sido introducida en las Islas Reunión controlando con éxito al psílido asiático en dicha localidad (Chien *et al.* 2006). Esta especie fue también introducida con éxito en la Isla de Guadalupe (Etienne *et al.* 2001). Sin embargo la introducción del parasitoide en otros países no ha sido tan exitosa, bien sea debido a factores ambientales, presencia de hiperparásitos o competencia con depredadores sobre el mismo huésped (Halbert y Manjunath 2004). *T. radiata* es un ectoparásito cuyas larvas se alimentan a expensas de las ninfas de *D. citri* debajo de su cuerpo, pupan allí mismos tejiendo un capullo adherido a la superficie de la hoja y emergen a través del integumento del huésped o momia por la parte dorsal del tórax. Otro factor de mortalidad causado por los adultos de este parásito es la succión de la hemolinfa al producir heridas en la cutícula de las ninfas, esto les proporciona proteínas a las hembras para la ovoposición.

El género *Tamarixia* se reportó por primera vez en Tamaulipas, atacando a *D. citri* en hojas de lima mexicana (Coronado *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2004). La especie *T. radiata* posee la habilidad de adaptarse a diferentes condiciones y debido a ello se ha utilizado exitosamente en programas de control biológico del psílido en otras partes del mundo (Aubert *et al.*, 1980; Etienne *et al.*, 2001; Chien *et al.* 1989).

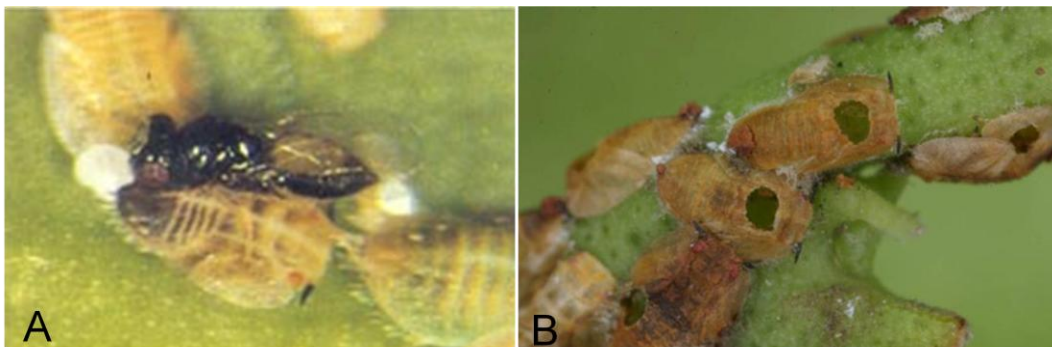


Fig. 8. A) Avispa *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) en ninfas de *D. citri*. (Fotografía por: FFTC, Taiwan). B) Emergencia de adultos del parasitoide *Tamarixia radiata* (Waterson), de ninfas momificadas del psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri* Kuwayama). Fotografía por: University of Florida

Hongos entomopatógenos

Entre las especies de hongos entomopatógenos que atacan al psílido asiático de los cítricos se encuentran: *Isaria fumosorosea* Wize (Samson, 1974; Subandiyah *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2004; Casique-Valdés y Sánchez-Peña, 2010); *Hirsutella citriformis* Speare (Subandiyah *et al.*, 2000; Cabrera, 2002; Etienne *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2007; Casique y Sánchez, 2010); *Lecanicillium lecanii* (Rivero-Aragón y Grillo-Ravelo, 2000; Xie *et al.*, 1988; Casique y Sánchez, 2010); En 1987, Aubert (citado por Halbert y Manjunath (2004)) indicó que los hongos entomopatógenos *Cladosporium* sp. y *Capnodium citri* Mont., podrían ser una buena alternativa para el control de *D. citri*, al determinar en Isla Reunión

una mortandad de ninfas entre 60% y 70%, cuando se presentaba humedad relativa mínima diaria superior al 87.9%. Etienne *et al.*, (2001), señaló que es común observar *H. citrifomis* Speare controlando psílidos cuando la humedad relativa fuese mayor al 80%. En observaciones realizadas durante el período Septiembre-Octubre 2009 por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coah. México (UAAAN), se encontraron adultos de *Diaphorina citri* en la región de Gómez Farías, Tamaulipas, México (con cercanía al río) infecciones por *H. citrifomis* mayores al 90% con humedad relativa entre el 70 y 80%. Estudios de biología molecular efectuados por la UAAAN, revelaron al hongo *Torrubiella* spp. infectando a *D. citri* y parasitando a *H. citrifomis* (ver fig. 7) Meyer *et al.* (2008) Informan de que existe un potencial para el desarrollo de *I. fumosorosea* en un insecticida microbiano; numerosos bioensayos corroboraron la infectividad de *I. fumosorosea* aplicando a ninfas de *D. citri* una concentración de 1×10^7 conidias/ml mortalidades mayores a 90% después de 4 días de exposición (Avery *et al.*, 2009, Hoy *et al.*, 2010); Así mismo, evaluaciones con *M. anisopliae* en ninfas de *D. citri* muestran mortandad del 90% (CNRCB, Colima) y bioensayos con cepas aisladas de suelo muestran mortandades mayores a 90% causadas por *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Datos no publicados).

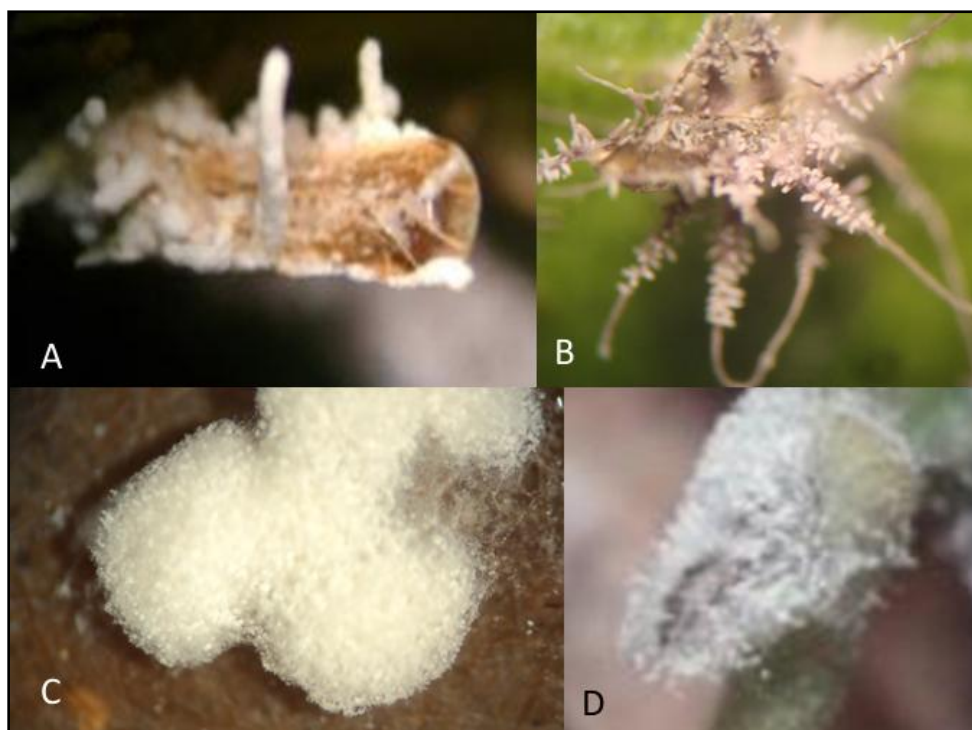


Fig. 9. A) *Torrubiella* spp. infectando al psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*. B) Sinemas del hongo *Hirsutella citrifomis* Speare sobre *Diaphorina citri* Kuwayama. C) Ninfa de *D. citri* infectada por *B. bassiana* en un bioensayo realizado en condiciones de laboratorio. D) *I. fumosorosea* infectando al psílido asiático de los cítricos *D. citri*. (Fotografías por: Rebeca Casique, UAAAN)

Biología y clasificación de los hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos se caracterizan por infectar todas las etapas de la vida de los insectos, se encuentran en hábitats acuáticos, terrestres y subterráneos e invaden el insecto por vía cutánea, siendo por esta causa los únicos patógenos capaces de infectar a insectos con aparato bucal picador, chupador succionador, Tisanópteros, Hemípteros (Roberts y Humber, 1981); infectan organismos en todos los órdenes de insectos, en su mayoría al orden Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera y Orthoptera (Ferron, 1978). Los estados inmaduros (ninfas y larvas) son más a menudo infectados por los hongos que en adultos, mientras que los estados de huevo y pupa no son frecuentemente infectados (Tanada y Kaya, 1993).

La mayoría de las especies son de las divisiones Ascomycota y Zygomycota (Entomophthorales). Los hongos ascomicetos eran divididos en dos grupos, los Ascomycetes y los Deuteromycetes, este último era conocido como hongos imperfectos, especies para las que ninguna fase sexual era conocida. Sin embargo ahora es posible asignar asociaciones con fases sexuales a muchos “deuteromycetes”, mediante estudios de cultivos y marcadores moleculares, por lo que la tendencia actual es descartar el uso del taxón “Deuteromycetes”. Roy *et al.*, (2006) menciona que los hongos imperfectos en la clase Hyphomycetes dentro de los Deuteromycetes como fases anamórficas de los Ascomycetes dentro del orden Hypocreales, familia *Clavicipitaceae* (Cuadro 1).

La familia *Clavicipitaceae* presenta un elevado grado de adaptabilidad expresado por sus características patológicas, biológicas, genéticas y ecológicas, manifestando su gran

variabilidad de formas y estructuras entre los diferentes géneros y especies existentes (Humber, 1981). Los hongos entomopatógenos son importantes agentes de control biológico de insectos y frecuentemente ocasionan epizootias que reducen significativamente sus poblaciones (MaCoy *et al.*, 1988). Se conocen más de 100 géneros y 700 especies, pero poco más de 10 han sido empleadas en el control biológico de insectos. Entre los más importantes se destacan *Beauveria*, *Metarhizium*, *Entomophthora*, *Aschersonia*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Isaria* y *Lecanicillium* (López y Hans, 2001; Hajeck y St. Leger, 1994) siendo estos los de mayor importancia en el control biológico por la susceptibilidad en los insectos plaga y por su fácil multiplicación (Monzón, 2001).

Se conoce un amplio rango de ciclos biológicos entre los hongos entomopatógenos que van desde el parasitismo obligado hasta patógenos oportunistas que pueden sobrevivir saprofiticamente en ausencia de un hospedante vivo. Los ciclos de vida de los parásitos obligados, como las especies del género *Coelomomyces* (Chytridiomycetes), pueden incluso envolver hospedantes intermediarios. Por otro lado, los hongos imperfectos presentan ciclo de vida más sencillo, falta de reproducción sexual y rango de insectos hospedantes considerablemente más amplio (Lecuona *et al.*, 1996).

En el orden Entomophthorales (Zygomycota), muchas especies son responsables de epizootias que normalmente regulan con éxito las poblaciones de insectos. Por otro lado, la mayoría de las especies de este orden son relativamente difíciles de producir en medios artificiales y sus conidias primarias tienen vida corta haciendo que las aplicaciones inundativas sean difíciles o imposibles (Lacey *et al.*, 2001; Eilenberg, 2002). Comparado con los Hyphomycetes los cuales presentan amplio rango de hospedantes y las epizootias

en general ocurren solamente en poblaciones de insectos del suelo, los Entomophthorales poseen corto rango de hospedantes y se asocian frecuentemente a insectos foliares o ácaros (Pell *et al.*, 2001; Eilenberg, 2002).

Un gran y complejo número de procesos interactivos, tanto ambientales como bióticos, son necesarios para el desarrollo o inhibición de epizootias causadas por hongos entomopatógenos, incluyendo la sensibilidad a la radiación solar; antagonistas microbianos; comportamiento del hospedante, condiciones fisiológicas, vigor y edad del patógeno; presencia de pesticidas; y temperatura, humedad y cantidad de inóculo apropiadas (Ferron *et al.*, 1991; Lacey y Goettel, 1995). Para obtener ventajas del potencial epizootico de los hongos entomopatógenos es necesario entender no solamente los determinantes críticos para la virulencia e infección del hongo sino también las técnicas de control sobre ellos a través de la optimización de las prácticas culturales, formulación y manipulación del medio ambiente. (Lacey *et al.*, 2001)

Cuadro 1. Clasificación de hongos entomopatógenos según Roy *et al.* (2006) de la división Zygomycota y Ascomycota.

División	Clase	Orden	Familia	Género
Zygomycota	Zygomycetes	Entomophthorales	Entomophthoraceae	<i>Entomophaga</i>
				<i>Entomophthora</i>
				<i>Erynia</i>
				<i>Eryniopsis</i>
				<i>Furia</i>
				<i>Massospora</i>
				<i>Strongwellsea</i>
				<i>Pandora</i>
				<i>Zoophthora</i>
			Ancylistaceae	<i>Conidiobolus</i>
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Clavicipitaceae	<i>Beauveria</i>
				<i>Cordyceps</i>
				<i>Cordycepioideus</i>
				<i>Lecanicillium</i>
				<i>Metarhizium</i>
				<i>Hirsutella</i>
				<i>Nomuraea</i>
				<i>Torrubiella</i>

Proceso de infección de hongos entomopatógenos

El ataque de estos hongos sobre el insecto huésped, se realiza en diferentes etapas divididas en: adhesión, germinación, diferenciación y penetración (Kouassi, 2001; Tanada y Kaya, 1993) (Fig. 9). El primer paso se produce cuando el conidio se adhiere a la cutícula. Para ello es necesario el reconocimiento y compatibilidad (por ejemplo de enzimas y glicoproteínas) entre el conidio y las células del tegumento del insecto, influida por dos acciones: una pasiva en la cual se ejercen fuerzas electroestáticas e hidrofóbicas, y otra activa, en la cual se secretan mucílagos, que interactúan químicamente con las lecitinas de la membrana y generan un ambiente favorable para la secreción de enzimas (Kouassi, 2001; Wong, 2003; Duperchy, 2003).

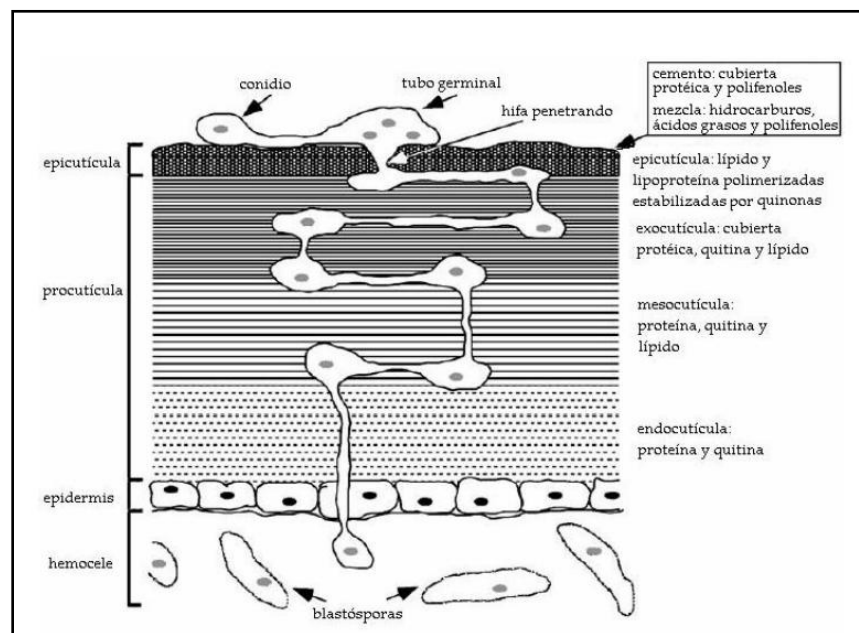


Fig. 10. Estructura y composición de la cutícula del insecto y esquema de la penetración por hongos entomopatógenos (Duperchy, 2003).

Una vez que se haya adherido, inicia la germinación; Se entiende por germinación el proceso mediante el cual una espora emite uno o varios pequeños tubos germinales, los cuales por crecimiento y alargamiento dan origen a las hifas (Volcy y Pardo, 1994) (Fig. 11); que es dependiente de las condiciones que le pueda brindar el insecto y el ambiente (Kouassi, 2001; Duperchy 2003). La diferenciación del hongo, inicia con la formación de un tubo germinativo, similar a un aprensorio, el cual ayuda a la penetración de la cutícula por actividad enzimática extracelular y presión mecánica (Gillespie, 1988; Wong, 2003). Después de llegar al hemocele, la mayoría de los hongos convierten el crecimiento micelial en una fase de levadura o sea crecimiento por gemación. Se producen toxinas y enzimas, aunque algunos hongos aparentemente no poseen toxinas, sino que matan el insecto al consumir todos los nutrientes o por destrucción física (Bustillo 2001).

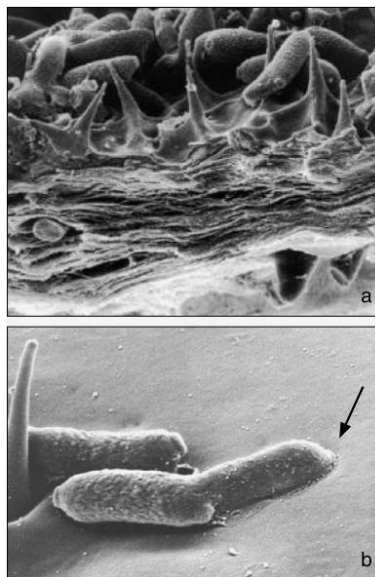


Fig. 11. a) Conidias del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre la cutícula de un insecto, b) formación del aprensorio. (Fotografía por: Pucheta *et al.*, 2006)

Finalmente, se produce la invasión y proliferación de las hifas en el tracto digestivo. Este paso ocurre luego de la muerte del insecto, ocasionado por daño mecánico, desnutrición y toxicidad, y es cuando las hifas secretan un antibiótico (oosporina), que ataca las bacterias del intestino (Ferron, 1978; Kouassi, 2001; Wong, 2003). Después de muerto el insecto, si la disponibilidad de agua es alta los hongos emergen al exterior a través de la cutícula y esporulan sobre el cadáver produciendo inoculo para infectar a otros insectos. Si las condiciones no son favorables, queda dentro del cadáver del insecto, donde puede sobrevivir por algunos meses y eventualmente producirá esporas cuando lleguen las condiciones favorables (Tanada y Kaya, 1993).

Formulación de Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos pueden ser empleados mediante aplicación inoculativa o introducciones puntuales del inoculo para iniciar ciclos de enfermedad y establecer el hongo en la población del insecto, lo que proporciona un control a largo plazo, o bien, mediante aplicación inundativa donde se utilizan insecticidas microbianos que inicia como una epizootia en la población y que conduce a su declive en un tiempo relativamente corto.

La eficacia de los hongos entomopatógenos depende de su virulencia y persistencia, así como de algunas características del insecto tales como el estado contra el que se realiza la aplicación, o la existencia de otros factores de estrés en el momento de realizarla. (Quesada-Moraga, 2002).

Para utilizar hongos entomopatógenos como insecticidas deben producirse cantidades masivas del hongo, el cual debe mantener su capacidad infectiva por un período de tiempo considerable. Los hongos se han reproducido para su uso como agentes biológicos de plagas desde hace 100 años, para lo cual se ha utilizado diferentes métodos de reproducción. Entre ellos, el uso de sustratos como arroz, trigo y medios líquidos mediante técnicas más sofisticadas (Vélez et al, 1997). En forma natural, los hongos satisfacen ciertos requerimientos nutricionales por la digestión enzimática de sus hospedadores (Heale *et al.*, 1989).

La formulación del hongo es el proceso mediante el cual el ingrediente activo, es decir las conidias del hongo, se mezclan con materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificantes y otros aditivos. Estos materiales inertes ayudan a que el hongo trabaje mejor. Todo esto se hace con el fin de lograr una buena homogeneidad y distribución de las partículas del hongo, para poder ser manipuladas y aplicadas adecuadamente. (Monzón, 2001).

Los resultados mejores se alcanzan con conidias producidas en medio sólido, intermedios con blastosporas o conidias sumergidas producidas en medio líquido, y los más bajos con los granulados a partir de micelio (Shah y Goettel, 1999). Por otro lado, la formulación es fundamental para la estabilización de los propágulos que constituyen la materia activa del micoinsecticida; mediante la estabilización, debe conseguirse mantener la viabilidad de los propágulos durante el almacenamiento y su posterior aplicación en campo. Así, las conidias pueden formularse en arcillas o en aceites vegetales para obtener polvos mojables o emulsionables, y contener determinados coadyuvantes para facilitar su

manejo y seguridad; por ejemplo: adherentes para aumentar su persistencia, factores nutritivos y humectantes para aumentar la velocidad de germinación y penetración (Wraight *et al.*, 2001).

Estos requerimientos también pueden ser suplementados en cantidades adecuadas en un medio de cultivo para lograr un máximo de crecimiento y esporulación. Los hongos entomopatógenos son muy susceptibles a la inactivación por la radiación ultravioleta del espectro solar (285-315 nm), aspecto en el que la formulación juega un papel fundamental (Jackson *et al.*, 2000). Las cepas seleccionadas para la producción de micoinsecticidas deben tener condiciones térmicas adaptadas a los hospedantes y hábitats donde van a ser empleadas (Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2000) y aunque siempre se ha pensado que la humedad relativa elevada es un factor fundamental, en la actualidad se sabe que las condiciones microclimáticas en la cutícula del insecto o del substrato vegetal o edáfico pueden ser suficientes para el proceso de infección (Quesada-Moraga, 2002).

Cuadro 2. Tipos y descripción de las principales formulaciones. (Urtubia y France, 2007)

Tipo de formulación	Descripción
Suspensión concentrada	Líquido con el ingrediente activo en suspensión, para aplicar diluido en agua
Concentrado emulsionable	Líquido homogéneo para ser aplicado como emulsión, luego de ser diluido en agua.
Polvo soluble	Polvo para aplicación luego de dilución de la(s) sustancia(s) activa(s) en agua, en forma de solución verdadera.
Polvo mojable	Polvo para aplicar como suspensión, luego de ser dispersado en agua.
Granulado dispersable	Gránulos para aplicación en forma de suspensión, luego de su desintegración y dispersión en agua.
Polvo seco	Formulación sólida, uniforme, en forma de polvo con buena movilidad, únicamente para aplicación directa en forma de espolvoreo.
Granulado	Formulación sólida, uniforme, en forma de gránulos con dimensiones bien definidas, para aplicación directa.
Granulado encapsulado	Gránulos para aplicación directa, que poseen una cobertura para protección o para liberación controlada de la(s) sustancia(s) activa(s).
Macrogranulado	Gránulos con rango de tamaño entre 2.000 y 6.000 μm
Microgranulado	Gránulos con rango de tamaño entre 100 y 600 μm
Líquido	Producto líquido para aplicar directamente, sin dilución previa.

μm : Micrón, equivalente a la milésima parte de un milímetro.

Para la aplicación en terreno se ha comprobado que el mejor método es hacer una suspensión de esporas en aceites vegetales o minerales, debido a que éstos contribuyen a proteger al hongo de los rayos ultravioleta, principal causa de pérdida de viabilidad, y además mejorar la adherencia, sobre todo en aplicaciones al follaje, para el control de plagas aéreas.

La principal dificultad con los aceites, es que se requiere necesariamente de una bomba de ultra bajo volumen, para utilizar una baja cantidad de aceite por superficie. No obstante, es posible utilizar agua como medio de aplicación de las esporas, pero solo resulta recomendable para el control de plagas subterráneas. En la aplicación de estos hongos, en general se recomienda una dosis mínima de 10^{12} esporas por hectárea, para las plagas que se encuentran expuestas a la acción directa de hongos, y dosis cercanas a 10^{13} para plagas subterráneas (Gerding *et al.*, 2003).

III. ARTÍCULO 1. PATHOGENICITY OF *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Cordycipitaceae) TO *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: PSYLLIDAE) AND *Bactericera cockerelli* (HEMIPTERA: TRIOZIDAE)

Casique-Valdés¹, A. Y. Reyes-Martínez, S. R. Sánchez-Peña, M. J. Bidochka and J. I. Lopez-Arroyo. 2011. Pathogenicity of *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Cordycipitaceae) to *Diaphorina Citri* (Hemiptera: Psyllidae) and *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). Florida Entomologist 94(3): 706-708.

PATHOGENICITY OF *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Cordycipitaceae) TO
Diaphorina citri (HEMIPTERA: PSYLLIDAE) AND *Bactericera cockerelli*
(HEMIPTERA: TRIOZIDAE)

R. Casique-Valdes², A. Y. Reyes-Martinez¹, S. R. Sanchez-Peña¹,
M. J. Bidochka² and J. I. Lopez-Arroyo³.

Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), Saltillo, Coahuila, 25315, Mexico. ² Department of Biological Sciences, Brock University, St. Catharines, ON, L2S 3A1, Canada; ³ INIFAP, Campo Experimental General Terán, N.L., 67413, México.

Insect-pathogenic fungi are important regulators of populations of their hosts and often cause epizootics. Fungi are essentially the only lethal entomopathogens capable of horizontal transmission in the insect order Hemiptera, whose sucking mouthparts prevent ingestion of microbial propagules of other entomopathogens that must infect the host orally (Ferron 1978).

Several psyllids (Hemiptera: Psylloidea) have emerged as vectors of the fastidious bacterium *Liberibacter*, which causes plant diseases of great concern. One such insect is the potato psyllid, *Bactericera* (= *Paratrioza*) *cockerelli* Sulzer, which vectors the *Liberibacter* causing “zebra chip” of potatoes; this insect is emerging as the main insect pest of solanaceous crops in the United States, Mexico, Guatemala, Honduras, New Zealand, and other countries (Munyanza *et al.* 2007; Lacey *et al.* 2009). Also, the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, vectors the devastating *Liberibacter* causing the Huanglongbing (HLB) disease of citrus plants. This last insect is exotic to the American continent, where it has successfully invaded all major citrus-producing areas, from the USA to Argentina. At many locations in Mexico, conspicuous epizootics on *D. citri* have been attributed to the fungus *Hirsutella citriformis* Speare (Clavicipitales: Hypocreales). However, little research has been conducted there on the fungus besides reports on its

distribution. Lacey *et al.* (2009) asserted that *Hirsutella* spp. should be tested on *B. cockerelli* due to the importance of the disease that this insect transmits.

We are interested in the infectivity of *Hirsutella* strains against both insects. In this work, fungal pathogens of the Asian citrus psyllid were collected in northeastern Mexico (states of Nuevo Leon, Tamaulipas and northern Veracruz) (Casique & Sánchez, 2010). In September-October 2009, numerous specimens of adult *D. citri* infected by *Hirsutella* cf. *citriiformis* were collected, especially in southern Tamaulipas state (municipalities of Gómez Farías and Llera). For isolation of cultures, fructifications (synnemata) were washed 3 times with gentamicin at 0.025 mg/ml and placed in potato dextrose agar plus 0.5% yeast extract (PDAY). The slow-growing fungal cultures produced typical fructifications harboring conidia. Cultures will be deposited at the USDA-ARSEF Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, Ithaca, NY. Synnemata from insects and cultures in water were mounted on slides in lactoglycerol-cotton blue or water, and were observed under phase contrast in an Olympus CX41 microscope (Olympus, Mexico City).

For molecular identification, one *Hirsutella citriiformis* strain inoculated on insects (HC817, see below) and additional strains (HC8D0, HC8D15 and HC8D16) were grown in liquid media (1% peptone, 1% dextrose, 0.5% yeast extract, and 0.3% malt extract) for 14 days (strain HC8D13 was not grown in liquid). The mycelia were removed by vacuum filtration onto filter paper and stored at -80°C. The samples were subsequently crushed in liquid nitrogen using a mortar and pestle and DNA was extracted with the Qiagen DNeasy plant mini kit (Qiagen Inc., Mississauga, Ontario). For PCR reactions, we used forward primer F63 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) and reverse primer LR3 (5'-

GTCCGTGTTTCAAGACGG) of the ribosomal large subunit D1-D2; PCR conditions and reactions were performed as described by Bidochka *et al.* (1994) and PCR products were sequenced; sequences were multiple-aligned using MEGA 4.1 (Tamura *et al.* 2007) with sequences accessed in GenBank (www.ncbi.com).

To confirm the infectivity of *Hirsutella* strains to *D. citri* and *B. cockerelli*, live insects specimens were collected from orange and pepper plants in Cadereyta, state of Nuevo León, Mexico. Adults of both species were anesthetized with compressed carbon dioxide (Wenninger *et al.* 2009). Using a soft paintbrush with few bristles, anesthetized insects were introduced onto Petri dishes containing fungal cultures; insects were placed over the synnemata in order to inoculate conidia onto the insect cuticle. In this way, *D. citri* was exposed to sporulating cultures of HC8D17 and HC8D13, each grown on agar (PDAY) in petri dishes, and on autoclaved wheat grains incubated in plastic bags; *B. cockerelli* was exposed to spores of both strains produced on PDAY. After one minute, insects were transferred to fresh, tender leaves of host plants (citrus or pepper); leaves were placed on disks of moistened yellow furniture sponge (3 cm thick) in 500-ml plastic containers. Control insects were handled similarly without exposure to fungus. Free water did not reach the leaves on containers. Anesthetized, inoculated insects usually awoke within two minutes and started feeding within 24 hours or less. Mortality was recorded every 24 hours after inoculation.

Morphological traits (see Figure 1) confirmed the identity of the fungus as *Hirsutella citriformis* Speare (Mains 1951, Meyer *et al.* 2007). Conidia measure 6.8-7.0 x 1.5-2 μm (n=10). Sequencing data and multiple-alignment analysis showed that strain HC8D17 (used

in inoculations) as well as additional strains (HC8D0, HC8D15 and HC8D16, all identified initially as *H. citriformis* using microscopy) showed 97-100% identity to and maximum scores with GenBank sequence DQ075678 (partial sequence of the 28S ribosomal RNA gene), obtained from *Hirsutella citriformis* strain ARSEF 2346 (Humber *et al.* 2011). Strain ARSEF 2346 was found to infect the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae) collected by M. Rombach in rice fields in Java (Indonesia) (Rombach *et al.* 1986; Humber *et al.* 2011).

Healthy *D. citri* and *B. cockerelli* adults inoculated with conidia of isolates HC8D13 and HC8D17 of *H. citriformis* died of mycoses by these fungi (Fig. 1). No control insects died of *Hirsutella* infections. *D. citri* and *B. cockerelli* inoculated with conidia from agar and wheat cultures were killed after 6 days, and synemmata emerged from the insect cadavers after 10 days. The macroscopic development of the fungus was very similar in both insect hosts; in *Bactericera*, some synnemata (Fig. 1) appeared to be longer, thinner and more ramified than on *Diaphorina*. Few reports have verified Koch's postulates in a *H. citriformis*-insect host system. *H. citriformis* was reported as pathogen of *D. citri* by Meyer *et al.* (2007) using field-collected infected insects and fungal cultures on rice as source of infective conidia. They reported that all insects died by 6-9 (-10) days post-inoculation. To our knowledge this is the first report of *H. citriformis* as a pathogen of *B. cockerelli*.

The potential of *H. citriformis* for the management of *B. cockerelli* is unknown. An approach towards its use could be inundative (=bioinsecticidal approach) by repeated application of *Hirsutella* spores. Another possibility is to induce epizootics by the introduction of the fungus into an agroecosystem, where subsequent reproduction on insects

(as shown herein), and horizontal transmission of the fungus occur. *Hirsutella* has a longer life cycle (about ten days) than for other entomopathogenic fungi such as *Beauveria* and *Isaria* (= *Paecilomyces*) (about five days). However, the production cycle of solanaceous crops (lasting close to 120 days) can be long enough for horizontal transmission and several replication cycles of *H. citriformis*, provided favorable conditions for sporulation and infection exist. In this case, *H. citriformis* could be a management tool for *B. cockerelli*.

Summary

This report confirms the identification of Mexican strains of *Hirsutella citriformis* isolated from Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. Two *H. citriformis* strains were pathogenic to adults of *D. citri* and of potato psyllid, *Bactericera cockerelli*.

Acknowledgment

The comments of Drion Boucias (U. Florida) and two anonymous reviewers improved this report. Supported by item 0202-0202-7104 from Dirección de Investigación, UAAAN, and CONACYT-INIFAP funds (FONSEC 108591).

References Cited

Bidochka, M. J., McDonald M. A., St Leger R. J. and D. W. Roberts. 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD), *Curr. Genet.* 25: 107-113.

Casique-Valdés, R. and S. R. Sánchez-Peña. 2010. Entomopathogenic fungi attacking the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in the Gulf citrus zone of Mexico. 58th Annual Meeting of the Southwestern Branch, Entomological Society of America, SW-ESA, Cancun, Mexico.

Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annu. Rev. Entomol.* 23: 409–442.

Humber, R. A., K. Hansen and M. Wheeler. 2011. Catalog of species. ARSEF, ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures. USDA-ARS, Ithaca, NY.

Lacey, L. A., F. de la Rosa and D. R. Horton. 2009. Insecticidal activity of entomopathogenic fungi (Hypocreales) for potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Trioizidae): Development of bioassay techniques, effect of fungal species and stage of the psyllid. *Biocontrol Sci. Tech.* 19(9): 957-970

Mains, E. B. 1951. Entomogenous species of *Hirsutella*, *Tilachlidium* and *Synnematium*. *Mycologia* 43: 691-718.

Meyer, J. M., M. A. Hoy and D. G. Boucias. 2007. Morphological and molecular characterization of a *Hirsutella* species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. *J. Invertebr. Pathol.* 95(2): 101-109.

Munyaneza, J. E. 2010. Psyllids as vectors of emerging bacterial diseases of annual crops. *Southwest. Entomol.* 35(3): 471-477.

Rombach, M. C.; R. M. Aguda, B. M. Shepard, and D. W. Roberts. 1986. Infection of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae), by field application of entomopathogenic Hyphomycetes (Deuteromycotina). *Environ. Entomol.* 15(5): 1070-1073.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.

Wenninger, E. J., L. L. Stelinski and D. G. Hall. 2009. Relationships between adult abdominal color and reproductive potential in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 102(3): 476-483.

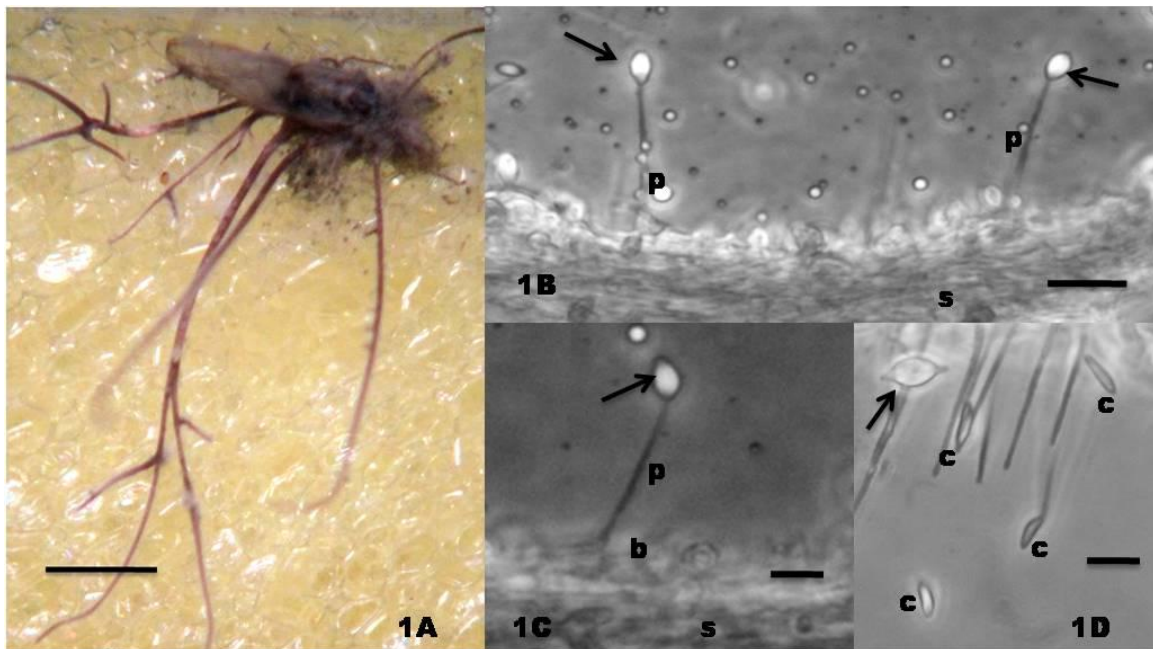


Fig. 1. Morphology of *Hirsutella citriformis*. A, ramified, sporulating fructifications (synnemata) of *Hirsutella citriformis* HC8D13 growing from infected *Bactericera cockerelli* 15 days after inoculation. Bar= 1.4 mm. B-D, phase contrast micrographs of the fungus grown on PDAY. B-C, surface of the synnema (s) of *H. citriformis*, with elongated conidiogenous cells (phialides); these consist of neck (p) and swollen base (b); conidium in mucilaginous ball (arrows). Bar B= 10 μ ; Bar C= 5 μ . D, single conidia (c) without mucilaginous material; conidia shaped as orange segments. Bar= 7 μ .

IV. ARTICULO 2. Field applications of entomopathogenic fungi for the control of the Asian Citrus Psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama in a citrus orchard in Mexico.

Casique-Valdés, R., Sánchez-Peña, S. R., Sánchez-Lara, B., Ek-Mass J., Guerra, C.

Abstract

Huanglongbing disease (HLB) which the asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae), transmits, has spread to certain areas of the country and it is necessary control measures do not affect the environment and population. Orange trees orchard was selected in Veracruz State in which we applied *Beauveria bassiana*, *Metarhizium ansiopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) (1×10^8 spores/ml) and *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) (1×10^7 spores/ml) grown on sterilized rice and liquid media and formulated in oil based emulsion (ME) and aqueous suspension (T20); Moisture conditions were low with high temperatures; shoots infested with *D. citri* were randomly selected after 72 hours of application. There were highly significant number of infected nymphs in the fungal treatments. Nymph infection (sporulated nymphs) between fungi and control were highly significant differences ($p < 0.0001$); there is no significant difference between formulation type. Interaction of entomopathogenic fungi and formulation type were significant ($P = 0.0417$); Application of *B. bassiana* strain B6C and *I.*

fumosorosea IF8B19 to *D. citri* nymphs provided significant percentages of infection (<70%). These applications showed that conidia either infected significant amounts of nymphs in the field, or conidia have a residual activity (infectivity) of at least three days under the conditions tested.

Key words: *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae), entomopathogenic fungi, field application, México

Abbreviations

C ml⁻¹ Conidia per milliliter

C g⁻¹ Conidia per gram

ME Agricultural mineral oil Purespray 22E (emulsion 0.5% in water)

T20 Tween 20 at 0.025% in water

Introduction

The vector of the bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. which cause Huanglongbing disease (HLB), *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), was reported in Mexico in 2002 (López *et al.* 2008). Research efforts to manage HLB and slow its spread have dramatically increased since HLB was detected in the country in 2009; it had spread over 9 states (SENASICA, 2011) and continuously has been conducted health campaigns to fight the psyllid and HLB. Due to the arbitrary use of insecticides and cost in managing these; entomopathogenic fungi as bioinsecticides, can be an effective alternative to

impediment the entry of HLB to production areas where the insect is present; Qureshi and Stansly (2007, 2009) state, that is necessary to combine management strategies such as biological control with chemical control resulting in conservation of natural enemies in addition to suppressing pests. Besides that, Avery *et al.* (2009), emphasize that this practice could be a low-cost autodissemination technique for entomopathogens propagated by the insect via horizontal transmission.

The entomopathogenic fungus, *Isaria fumosorosea* Wize (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (Hypocreales: Cordycipitaceae) can infect a wide range of citrus pests, it has been reported by several authors attacking *D. citri* (Avery *et al.* 2009; Meyer 2007; Meyer *et al.* 2008; Subandiyah *et al.* 2000; Hoy *et al.* 2010) and is compatible with non-target arthropods (Sterk *et al.* 1995; Avery *et al.* 2008, cited by Avery *et al.* 2009). *M. anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin and *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Clavicipitaceae) occur ubiquitously around the world in alternating life stages between a soil saprophytic stage and an insect pathogen stage (Leland 2001) and are well known to kill various insects including sucking pests (Feng and Johnson 1990; Feng *et al.* 1996; Wraight *et al.* 1998). The integration of fungal formulations into pest management systems against sucking insects become a useful alternative (Poprawski *et al.* 1999; Vandenberg *et al.* 2001) and can be mass produced and formulated for field use (Feng *et al.* 1994). In this work we evaluated fungal infection after the application of fungal conidia in a citrus orchard, formulated either as an oil emulsion of agricultural mineral oil in water or as an aqueous suspension in water plus surfactant.

Material and methods

Cultivation of the entomopathogenic fungal strains

Three fungal strains, one each of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. B6C, *Isaria fumosorosea* Wize IF8B19 (Hypocreales: Clavicipitaceae) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin 6M11 (Hypocreales: Cordycipitaceae) were used. *Isaria fumosorosea* was originally isolated from *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) collected on orange jessamine, *Murraya paniculata* in the town of Gomez Farias, Tamulipas, Mexico (22 ° 59'33"N, 99° 8'34 .82"W). *B. bassiana* and *M. anisopliae* strains were both isolated from soil at a citrus orchard in Yerbaniz, Santiago, Nuevo León, México (25°21'5.15"N, 100°4'48.1"W) according to the method used by Herlinda *et al.* (2010) using third instar larvae of yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) as bait. Samples were taken by digging random soil samples 10-15 cm deep from the orchard and placed in containers of 500 ml. 4-5 larvae were buried 0.5 cm deep in each container. Six days later, dead larvae were placed in sterile petri dishes with moist cotton balls, the dishes were sealed with adhesive tape and incubated in the laboratory. Fungal growth was transferred to agar. All fungi from soil and *D. citri* were isolated using 1.5% agar plates of PDMY modified medium (0.5% yeast extract, 0.3% malt extract, 1.0% polypeptone, 1.0 % dextrose, 0.5mg/ml gentamicine) (Subandiyah *et al.* 2000).

Small-scale production for conidia of entomopathogenic fungi

Fungi were grown on either liquid media or autoclaved rice in polyethylene bags as follows. Fungal inoculums were produced in liquid culture media SPMY (1% Peptone, 0.5% yeast extract, 1% sucrose, 0.3% malt extract). 600 ml of liquid media in 1L flasks was inoculated with a conidial suspension. Flasks were then incubated to produce fungal biomass for 4 days by stirring at room temperature and 150 rpm on an Orbit 1000 shaker, (Labnet International, Inc., Edison, NJ).

Production on solid substrate: 100 g of rice was placed in individual 1000 ml polyethylene bags with water (250 ml aprox.); bags were closed with a knot and autoclaved at 121°C for 30 min. After cooling, 10 ml of biomass suspension from flasks (as described above) of each fungus plus 1 mg/ml of penicillin was inoculated into each bag, separately. Bags were then incubated for 15 days at room temperature (Sahayaraj and Namasivayam 2008); conidia were harvested from fungus-colonized grains using anti-aphid mesh bags (20 x 30 cm). The conidial powder was placed in the refrigerator (4°C until use). Little portions of powder were blended in T20 to break up clumps of conidia; concentrations of conidia per gram of harvested material were determined with a haemocytometer. This ordinary method was used by Aquino *et al.* (1977), Mendonça (1992), Feng *et al.* (1994), Pu *et al.* (2005)

Biphasic method: 60 ml of biomass in broth (filamentous and yeast-like growth) of each fungus (as described above) were placed in polystyrene trays (30cm x 18cm), leaving a thin layer to promote aerial conidia production; trays were incubated for 8 days at room

temperature with 100% RH; conidial growth on trays were harvested by scraping the conidial layer with a spatula after being dried at room temperature for 3 days. Similar production was realized by several authors but placing biomass produced in grains (Mascarín *et al.*, 2010; Hoy *et al.*, 2010; Sahayaraj and Namasivayam 2008, Derakhshan *et al.* 2008). To determine the biphasic spore production per ml, 4 ml of biomass in broth were placed in Petri dishes (5 dishes/fungus) and incubated for 8 days; conidia were scrapped and counted in T20 (with a haemocytometer) (see Table 1).

Application of conidial formulations in the field

Conidia of 6M11, B6C and IF8B19 (viability >80%) were formulated either as an aqueous suspension T20 (using as dispersant Tween 20 at 0.025% in water) (Aswini *et al.* 2007) and an emulsifiable suspension of agricultural mineral oil Purespray 22E at 0.5% in water (ME) (PetroCanada, Mississauga, Ontario); suspensions were blended for 15 seconds and adjusted at final volume of 1.0×10^8 C ml⁻¹ except for *I. fumosorosea* at 6×10^7 C ml⁻¹ (8-10 liters) with purified drinking water for both types of formulation; suspensions were applied immediately after doing the formulations.

Formulations were applied in an orange grove (50m x 120m) located in Martinez de la Torre, state of Veracruz, Mexico (20°02'30.79''N, 97°05'55.41''W). Weather is hot, humid, tropical (annual average temperature and precipitation of 23.4°C and 1840 mm, respectively). In agroecological terms, the region is in tropical semi evergreen forest, in a climatic transition zone between the coastal sub-humid region to the west and the moist

Sierra Madre Oriental region to the east (UNAM 2011). The orchard had not been sprayed with insecticides and fungicides for at least eight months and trees were not pruned. The average temperature ranged from 32°C (April 11th 2011) to 37 °C (April 18th 2011). The average relative humidity ranged from 55% (April 11th 2011) to 70% (April 18th).

Table 1. describes the treatments evaluated on the field *B. bassiana*-ME, *B. bassiana*-T20, *I. fumosorosea*-ME, *I. fumosorosea*-T20, *M. anisopliae*-ME and *M. anisopliae*-T20 at concentration described above. including ME spray control and an absolute control.

Fungi/ Treatment	Formulation type	Concentration	Number of applications
<i>B. bassiana</i>	T20	1x10 ⁸ C ml ⁻¹	1
<i>B. bassiana</i>	T20	1x10 ⁸ C ml ⁻¹	2
<i>B. bassiana</i>	ME	1x10 ⁸ C ml ⁻¹	1
<i>B. bassiana</i>	ME	1x10 ⁸ C ml ⁻¹	2
<i>I. fumosorosea</i>	T20	5.6x10 ⁷ C ml ⁻¹	1
<i>I. fumosorosea</i>	T20	5.6x10 ⁷ C ml ⁻¹	2
<i>I. fumosorosea</i>	ME	5.6x10 ⁷ C ml ⁻¹	1
<i>I. fumosorosea</i>	ME	5.6x10 ⁷ C ml ⁻¹	2
<i>M. anisopliae</i>	T20	1x10 ⁸ C ml ⁻¹	1
<i>M. anisopliae</i>	T20	1x10 ⁸ C ml ⁻¹	2
<i>M. anisopliae</i>	ME	1x10 ⁸ C ml ⁻¹	1
<i>M. anisopliae</i>	ME	1x10 ⁸ C ml ⁻¹	2
Control	ME		1
Control	ME		2
Absolute control			

T20= aqueous suspension of Tween 20 at 0.025% in water. ME= Emulsion of agricultural mineral oil Prespray foliar 22E in water. Number of applications with an interval of 24 hours (1-2)

Each treatment included 10 replications (a randomly designated tree); trees were 1-2.5m tall, planted at 2 m apart in the row with rows 2-3 m apart; thus, a completely randomized design was conducted with factorial arrangement 3x2x2 (fungi, number of applications and formulation type, respectively). Each application (fungal preparation) consisted of approximately one liter/tree. For the treatments differing in number of applications (1 or 2), 10 trees/treatment were treated first with 1L approximately of fungal preparation, and a subset of 5 trees from each of the previous treatments were sprayed twice (IL) with an interval of 24-hours. The rationale was to try to infect nymphs that emerged from eggs after the first application. Fungi were sprayed using a gasoline-powered backpack sprayer (STIHL SR-420) (2.6 kW power, displacement 56.5 cm³, Weight: 11.1kg.).

Data collection

Daily temperature and RH records were taken during the application and incubation period from local weather station. Collection of field samples was conducted either 72 hours after the first application or 48 hours after the second application. 15 to 20 shoots were collected randomly per tree and placed in 16.5 x14.9 cm plastic bags (Ziploc, S. C. Johnson, Racine, WS); bags with shoots were transported to the laboratory and were incubated at room temperature for 3 days. Half of the bags with shoots were placed in coolers with ice for transportation to the laboratory for 20 hours, and subsequently placed

in the refrigerator (4°C); we attempted to kill the nymphs and at the same time slow down the development of the fungus in nymphs and to be able to dissect, observe microscopically or grow the fungus from inside the nymphs indicating internal fungal colonization; nymphs (in plastic bags) were then transferred to a moist chamber at 25°C for 48 hours. We determined the % of infection from the total number of nymphs collected per tree, by counting those with patent sporulation of the specific fungi, visible under the stereoscope. We also considered as infected nymphs those that had a pink pigment in the hemocoel, as reported for *B. bassiana* (Propawski *et al.* 2000; Amin *et al.* 2010).

Data analysis

Levene's test and Shapiro-Wilk test of each treatment were conducted to determine normality and homogeneity of variance of the data sets; Analysis of Variance using GLM procedure with the SPSS 13.0 program (SPSS, 2003) was performed and means were separated with Tukey's Honestly Significant Difference (HSD).

Results

Small-scale production for conidia of entomopathogenic fungi

When spore production yields of B6C, 6M11 and IF8B19 were evaluated, 6M11 and B6C produced on rice and liquid media, produced significantly more spores ($7.9 \times 10^8 \pm 2.8 \times 10^8$, $9.09 \times 10^8 \pm 1.1 \times 10^8$ respectively) than IF8B19 ($7.9 \times 10^8 \pm 2.8 \times 10^8$) (Table. 2). There was no significant difference in yields on both production methods; production ranging from 2.4×10^7 to 9.8×10^8 C ml⁻¹ or C g⁻¹. Yields of harvested conidia per gram of powder were 2.1×10^{12} C Kg⁻¹ of rice and 2.8×10^{11} C L⁻¹ of liquid media.

Table 2. Spore production by the method of inoculated sterilized rice per gram and liquid media per ml \pm SE

Strain	Origin	Host	Fungus	Spore production/ (ml or g) \pm SE		
				Mean \pm SE	Rice	Liquid media
B6C	Nuevo León, México	<i>Tenebrio molitor</i>	<i>B. bassiana</i>	$9.09 \times 10^8 \pm 1.1 \times 10^8$ a	$1.1 \times 10^9 \pm 1.0 \times 10^8$ a	$4.2 \times 10^8 \pm 3.4 \times 10^7$ a
6M11	Nuevo León México	<i>Tenebrio molitor</i>	<i>M. anisopliae</i>	$7.9 \times 10^8 \pm 2.8 \times 10^8$ a	$9.8 \times 10^8 \pm 3.8 \times 10^8$ a	$3.04 \times 10^8 \pm 1.1 \times 10^7$ a
IF8B19	Tamaulipas, México	<i>Diaphorina citri</i>	<i>I. fumosorosea</i>	$9.03 \times 10^7 \pm 2.5 \times 10^7$ b	$3.3 \times 10^7 \pm 7.7 \times 10^6$ a	$2.4 \times 10^8 \pm 1.1 \times 10^7$ a

Means followed by the same letter in a column are not significantly different (Turkey's HSD, P= 0.05)

Application of conidial formulations in the field

We observed that the light mineral oil used (Purespray foliar 22E) did not produce stable emulsions. In suspensions left motionless, conidia produced a more or less separated phase on top of the liquid within minutes. This appeared to be more marked (or was easier to see) in *Metarhizium*. This was somewhat unexpected because emulsions and suspensions of conidia in other oils (including different types and brands of mineral and vegetable oil; (Vega-Aquino *et al.* 2009; unpublished observations) were very homogeneous and much more stable at similar spore concentrations. This phase separation could have been an effect of the relatively high spore concentration. Thus the sprayer was maintained constantly in motion (rocked sideways, etc) as much as possible to keep conidia suspended. RH during application was around 75%. Temperatures averaged from (55%) to (75%); negligible precipitation occurred during the trial after spray.

In the case of the half of the samples placed in coolers, the volume and number of samples and bags (>100) prevented their rapid cooling, with most nymphs dying after 3 days in the refrigerator. After observing this situation, these samples were processed the same way as the others, as described in the Materials and Methods section. Unless indicated otherwise, the results below, refer to the samples maintained at ambient temperature, because these had higher infection percentages and the development.

Abundant sporulation was observed in nymphs collected 72 hours after the first fungal application and maintained for further 72 hours under high humidity conditions at ambient temperature (25-32 C) (total of 144 hours, or 6 days). See fig. 2

The ANOVA indicated highly significant differences regarding the mean infection percentages among treatments and controls ($F= 20.88$, $df= 4$, $p< 0.0001$). Table 4 shows Tukey's multiple means comparison among all treatments; there were no statically difference among the interaction between fungi, formulation type and number of applications. Regarding main effects of factors, no significant difference was detected on infection percentages caused by conidia among the fungi *B. bassiana*, *I. fumosorosea* and *M. anisopliae* (see table 3). The percentage of infection averaged 58.6% for nymphs treated with conidia in surfactant (T20) and 39.6% for nymphs treated with conidia in emulsion (ME) as main factor (formulation type); these were not significantly different but they were significant compared to controls ($F = 4.03$ $df = 1$, $P= 0.049$). *B. bassiana*-ME (1 and 2 applications) induced values over 80% of infection; Table 5 shows all treatments including nymphs refrigerated at 4°C.

Table 3. Percentage of infection caused by fungi on the field. Means with the same letter in the column are not significantly different (Tukey's HSD, $P=0.05$)

Fungus (Treatment)	% Infection
<i>B. bassiana</i>	69.2 ± 4.13 a
<i>M. anisopliae</i>	46.7 ± 5.60 a
<i>I. fumosorosea</i>	45.7 ± 5.28 a
Control	2.28 ± 1.61 b
Absolute control	0.0 ± 0.0 b

$F= 20.88$, $df=4$ $p<0.00001$

Means followed by the same letter in a column are not significantly different (Tukey's HSD, $P= 0.05$)

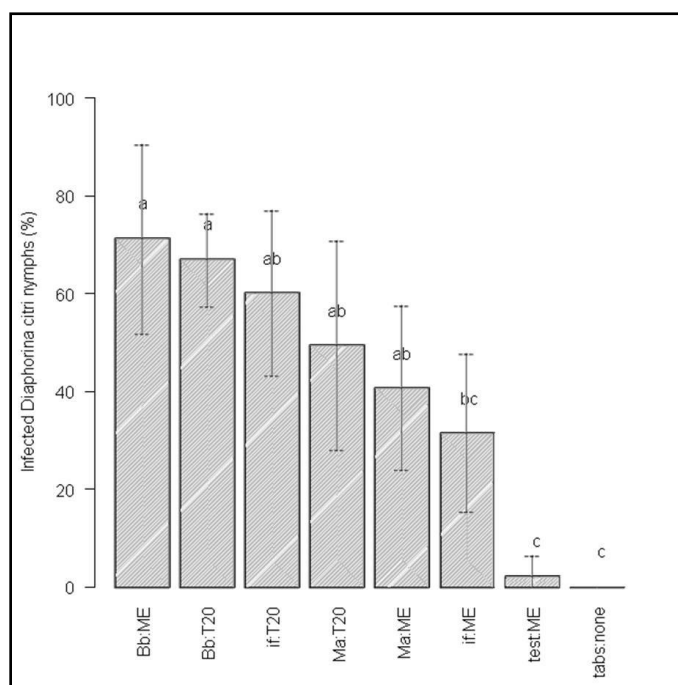


Fig 1. Percentage of infected *Diaphorina citri* nymphs (mean \pm SE) for the interaction of fungi (Bb= *B. bassiana*, if= *I. fumosorosea*, Ma= *M. anisopliae*) and type of formulation (ME or T20). Means followed by the same letter in the bar are not significantly different (Tukey's HSD, P= 0.05)

Table 4. Interaction factors of evaluated fungi, formulation type and number of applications.

Fungus	Formulation	Number of applications	% Infection
<i>B. bassiana</i>	ME	2	80.8 \pm 10.1
<i>B. bassiana</i>	T20	1	67.8 \pm 2.4
<i>I. fumosorosea</i>	T20	1	67.5 \pm 12.1
<i>B. bassiana</i>	T20	2	66.0 \pm 8.1
<i>B. bassiana</i>	ME	1	61.8 \pm 9.6
<i>M. anisopliae</i>	T20	2	54.7 \pm 17.7
<i>I. fumosorosea</i>	T20	2	54.4 \pm 6.4
<i>M. anisopliae</i>	T20	1	46.1 \pm 8.1
<i>M. anisopliae</i>	ME	1	44.0 \pm 10.4

<i>M. anisopliae</i>	ME	2	39.0 ± 8.8
<i>I. fumosorosea</i>	ME	1	32.6 ± 7.1
<i>I. fumosorosea</i>	ME	2	31.0 ± 9.4
Control	ME	2	4.0 ± 2.6
Control	ME	1	0.0 ± 0.0
Absolute control			0.0 ± 0.0

Fungi* Formulation* Number of applications: F= 0.96, df= 2, p= 0.38998

T20= aqueous suspension of Tween 20 at 0.025% in water. ME= Emulsion of agricultural mineral oil Prespray foliar 22E in water. Number of applications with an interval of 24 hours (1-2). Means followed by the same letter in a column are not significantly different (Turkey's HSD, P= 0.05)

There were not significant differences on nymph infection considering as main factor number of applications (1 vs. 2) ($F = 0.1631$, $df = 1$, $p = 0.6880$). The percentage of infection was significant regarding the interaction of fungi and formulation ($F = 3.393$, $df = 2$, $p = 0.0416$) with a major average of infection of 71.3% induced by *B. bassiana*-ME (Fig. 1). *I. fumosorosea* caused more infections in the T20 formulation (60.2%) than ME (31.6%); it is important to remember that the concentration of conidia of *I. fumosorosea* was 5 times lower than the other treatments. *B. bassiana*-ME was statistically different from *I. fumosorosea*-ME, and also respect absolute control and ME control (0% and 2.28% respectively). *M. anisopliae* induced 40.8% in ME and 49.6% in T20, not being statically different (Fig. 1). Growth of known saprophytes (*Fusarium* and *Cladosporium*) on nymphs was minimal on controls. Table 5 (includes all treatments with incubation data) shows significant differences considering the temperatures of incubation; 25-32°C range of

temperature induced more percentages of infection. *B. bassiana* in ME produced >80% of sporulated nymphs incubated at room temperature or refrigerated for 72 hours respectively.

Table 5. Total of treatments applied on the field, including nymphs refrigerated at 4°C

Fungus/ Treatment	Formulation type	Number of applications	Incubation	% infection
<i>B. bassiana</i>	Oil	2	4°C	88.0±6.4 a
<i>B. bassiana</i>	Oil	2	25-32°C	80.8±10.1 ab
<i>I.fumoso</i> rosea	Oil	1	4°C	69.7±12.3 abc
<i>B. bassiana</i>	Tween	1	25-32°C	67.8±2.4 abc
<i>I.fumoso</i> rosea	Tween	1	25-32°C	67.5±12.1 abc
<i>B. bassiana</i>	Tween	1	4°C	66.0±13.6 abc
<i>B. bassiana</i>	Tween	2	25-32°C	66.0±8.1 abc
<i>B. bassiana</i>	Oil	1	25-32°C	61.8±9.6 a-d
<i>M. anisopliae</i>	Tween	2	25-32°C	54.7±17.7 a-e
<i>I.fumoso</i> rosea	Tween	2	25-32°C	54.4±6.4 a-d
<i>I.fumoso</i> rosea	Oil	2	4°C	50.3±14.1 a-d
<i>I.fumoso</i> rosea	Tween	2	4°C	47.0±9.0 a-d
<i>B. bassiana</i>	Oil	1	4°C	46.6±13.3 a-d
<i>M. anisopliae</i>	Tween	1	25-32°C	46.1±8.1 a-d
<i>M. anisopliae</i>	Oil	1	25-32°C	44.0±10.4 a-d
<i>M. anisopliae</i>	Oil	2	25-32°C	39.0±8.8 a-d
<i>B. bassiana</i>	Tween	2	4°C	35.0±21.7 a-d
<i>I.fumoso</i> rosea	Oil	1	25-32°C	32.6±7.1 a-d
<i>M. anisopliae</i>	Oil	1	4°C	32.3±24.3 a-d
<i>I.fumoso</i> rosea	Oil	2	25-32°C	31.0±9.4 a-e
<i>I.fumoso</i> rosea	Tween	1	4°C	25.0±12.1 b-e
<i>M. anisopliae</i>	Tween	2	4°C	23.2±7.8 b-e
<i>M. anisopliae</i>	Oil	2	4°C	21.2±11.9 b-e

<i>M. anisopliae</i>	Tween	1	4°C	12.5±12.5 cde
control	Oil	2	25-32°C	4.0±2.6 de
control	Oil	2	4°C	0.6±0.6 e
control	Oil	1	4°C	0.0±0.0 e
control	Oil	1	25-32°C	0.0±0.0 e
Absolute control			4°C	0.0±0.0 e
Absolute control			25-32°C	0.0±0.0 e
F=31.3, df=4, p<0.00001***	F=.002, df=1 p=0.96	F=.013, df=1 p=0.907	F=5.6,df=1 p=0.019 *	
Treatment*Formulation*Number of applications* Incubation: F= 3.05, df=2, p=0.051				

Oil= ME, Tween= T20; 4°C= Nymphs which were refrigerated for 72 hours and then transferred to moisted chambers, 25-32°C= range which nymphs were incubated into Zyploc ® bags for 72 hours and then transferred to moisted chambers. Means followed by the same letter in a column are not significantly different (Turkey's HSD, P= 0.1)

The methods used do not allow us to discern clearly whether nymphs were already infected in the field at the time of sample collection or whether they became infected in the laboratory from residual conidia.

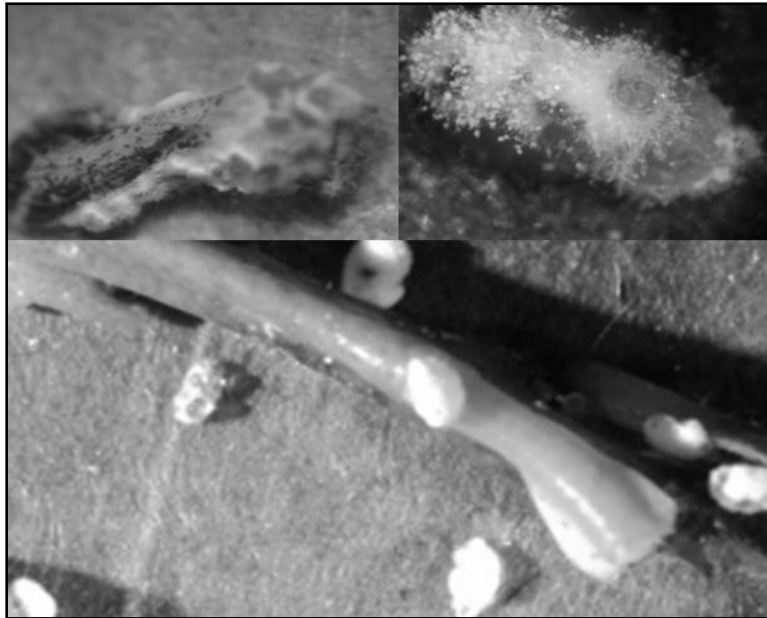


Fig 2. a) Adult psyllid infected with *M. ansiopliae* at 96 hours of infection; b) *D. citri* nymph infected with *I. fumosorosea* on T20. c) *D. citri* nymphs infected with *B. bassiana* in ME

Discussion

The observation of patent, complete fungal growth (including abundant production of conidia), on insects incubated six days after application of fungi in the field indicates that it is likely that the insects were infected in the field and had incipient fungal development in them when collected. Alternatively, it is also possible, but less likely considering the relatively brief incubation time (72 hours) in plastic bags, that the nymphs were infected in the bags, from residual, viable conidia present on the shoots. Nevertheless, the effect produced by conidia picked up from leaf and soil surfaces together is higher than direct contact with the spray; in an experiment using oxybenzone as sunlight protector with oil formulation using *M. flavoviridae* enhanced protection to conidia with the first 3 days of field application (Aduh-Mensah 2002). Prior *et al.* (1988) cited by Aduh-Mensah (2002) report that conidia in oil have enhanced more infection (36 times more) than those

suspended in water, in this field experiment, we reported no statically differences between formulation type using an emulsifiable suspension with agricultural mineral oil and an aqueous suspension of tween 20 at 0.025% in water.

Further investigations should focus on the precise insect-fungus interactions in this system. The prospective of developing IF8B19, 6M11 and B6C as bioinsecticides against *D. citri* nymphs might be might be an important candidates for horizontal transmission (Avery *et al.* 2009); However, few studies have been published about field trials with this fungi (Srinivasan *et al.* 2008, Hoy *et al.* 2010).

Mass produced conidia did not show statically differences in both methods used, but production of *I. fumosorosea* was very slow in grains and from 20 bags of cultured rice we obtained approximately 4 grams of harvested conidia; we found the liquid media technique easier than inoculated rice, by obtaining aerial conidia in light layers of broth; the fungus can grow in fermenters to the end of the log phase for maximal production of mycelia biomass, which was subsequently transferred on to inert substrates after 4 days of stirring (Feng *et al.* 1994). Despite being reported by several authors (Soper and Ward 1981; Rombach *et al.* 1988; Rombach 1989; Bradley *et al.* 1992) that the biphasic method is the most expensive, with this technique, was observed that the fungus grown at the end of the logarithmic phase and placed in plastic trays or aluminum, could be a low cost and contamination free method. The liquid fermentation is an alternative to reduce the lead time in the production process of some fungi (Li *et al.* 2010), aerial conidia tend to be more tolerant to desiccation and more stable as a dry preparation compared to submerged conidia (Jackson 1997). *B. bassiana* concentration where then times lower than reported by Pu *et*

al. (2005) with concentration of 1×10^{10} spores/ml on the field. During the first application the RH was approximately 72% and temperature reached 37°C, in the second application the %RH increased because low precipitation was present; Despite low ranges of %RH were present, >80% of infection of *D. citri* nymphs were recorded, at 5 days of incubation; Most of the nymphs died when were transferred from Zyploc® bags to a moist chambers; we observed some sporulation on *D. citri* nymphs attached to the walls of the bag, because of that, the question whether the nymphs were infected in the bag because the residual spores in formulations or if they were infected in the field, raises. No microscopically observations were done to verify the presence of fungus in dead nymphs which did not sporulate. Data suggest that fungal applications with *I. fumosorosea*, *B. bassiana* and *M. anisopliae* infected psyllid adults (Fig. 2) too, but we could not disclose. In this trial, the most important control of *D. citri* nymphs in orange garden was achieved by applications of *B. bassiana* preparation with ME of 1.0^{13} conidia/ha with an overall mean efficacy of 72% and 80% with two applications. This was the first report on the potential of *B. bassiana* and *M. anisopliae* for control of *D. citri* nymphs on the field.

In the present study, the treatment Bb-ME yielded an obviously better control than Bb-T20 but application effects were not evident in the trial. *D. citri* nymphs control was equally satisfactory when the fungal formulation was applied with T20 or ME. The use of fungal formulations for insect control on orange trees has a great potential in Mexico particularly when these applications could do in orchards with rainy months and temperate weather being favorable to the use of fungal formulations against *D. citri* nymphs.

Acknowledgment

This research was partially supported by the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP, Mexico) and Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Thanks are due to Dr. Sergio Curti and his collaborators (INIFAP) for their technical assistance during the experiment.

References

Aduh-Mensah. 2002. Primary and secondary uptake of conidia of entomopathogenic fungi and the effect of oxybenzone as a chemical sunlight protector. Ghana. J. Sci. 42: 3-10

Amin GA, Youssef NA, Bazaid S, Saleh WD. 2010. Assessment of insecticidal activity of red pigment produced by the fungus *Beauveria bassiana*. World J. Microbiol. Biotechnol. 26(12): 2263-2268

Aquino MLN, Vital AF, Cavalcanti VLB, Nascimento MG (1977) Cultura de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em sacos de polipropileno, Boletim Tecnico CODECAP. 5: 7-11.

Aswini GV, Manujanatha M, Naik MI (2007) Field Efficacy of Entomopathogenic Fungus, *Fusarium semitectum* Berk and Ravenel Against Sugarcane Woolly Aphid, *Ceratovacuna lanigera* (Homoptera: Aphididae). Karnataka J. Agric. Sci. 20(4): 857-858

Avery PB, Hunter WB, Hall DG, Jackson MA, Powell CA, Rogers ME (2009) *Diaphorina citri* (Hemiptera: psyllidae) infection and dissemination of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: cordycipitaceae) under laboratory conditions. Florida entomol. 92 (4): 608-611

Avery PB, Faull J, Simmonds MSJ (2008) Effects of *Paecilomyces fumosoroseus* and *Encarsia formosa* on the control of the greenhouse whitefly: preliminary assessment of a compatibility study. BioControl 53: 303-316.

Bradley C, Black W, Kearns R, Woods P (1992) The role of production technology in mycoinsecticide development. In: Leatham G (ed) Frontiers in Industrial Mycology (Mycological Society of America Symposium on Industrial Mycology, Madison, WI, June 1990. Chapman & Hall, New York.

Derakhshan A, Rabindra RJ, Ramanujam B, Rahimi M (2008) Evaluation of different media and methods of cultivation on the production and viability of entomopathogenic fungi, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. Pak. J Biol. Sci. 11(11):1506-1509.

Feng MG, Poprawski TJ, Khachatourians GG (1994) Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. Biocontrol Sci.Technol. 4 (1): 3-34.

Feng MG, Johnson JB (1990) Relative virulence of six isolates of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) on the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). Environ. Entomol. 19: 785–790.

Feng MG, Tang QY, Hu GC, Huang SW (1996) Susceptibility of seven species of aphids to a *Beauveria bassiana* isolate: analysis of time-dose-mortality model. J. Basic Sci. Eng. 4: 22–23.

Herlinda S, Irsan C, Mayasari R, Septariani S (2010) Identification and Selection of Entomopathogenic Fungi as Biocontrol Agents for *Aphis gossypii* from South Sumatra. Microbiol. Indones. 4(3):137-142

Hoy Marjorie A, Singh Raghuwinder, Rogers Michael E (2010) Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: psyllidae). Florida Entomol. 93 (1): 24-32

Jackson MA (1997) Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agent. J. Ind. Microbiol. Biot. 19: 180-187

Jenkins NE, Heviefio G, Langewald J, Cherry AJ, Lomer CJ (1998) Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol News Inform 19:21-31

Leland, JE (2001) Environmental-Stress Tolerant Formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* for Control of African Desert Locust (*Schistocerca gregaria*). Dissertation submitted to the Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree Of Doctor of Philosophy in Entomology.

Li Zengzhi, Alves Sérgio B, Roberts Donald W, Fan Meizhen, Delalibera Jr. Italo, Tang Jian, Lopes Rogério B, Faria Marcos, Rangel Drauzio EN (2010) Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi, *Biocontrol Sci. Technol.* 20 (2): 117-136

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

Mascarin GM, Alves SB, Lopes RB (2010) Culture Media Selection for Mass Production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.53 n. 4: pp. 753-761

Meyer JM (2007) Microbial associates of the Asian citrus psyllid and its two parasitoids: symbionts and pathogens. Ph.D. Dissertation, University of Florida, Gainesville, 145 pp.

Meyer JM, Hoy MA, Boucias DG (2008) Isolation and characterization of an *Isaria fumosorosea* isolate infecting the Asian citrus psyllid in Florida. *J. Invertebr. Pathol.* 99: 96-102

Poprawski TJ, Parker PE, Tsai JH (1999) Laboratory and field evaluation of hyphomycete insect pathogenic fungi for control of brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae). *Environ. Entomol.* 28, 315–321.

Poprawski TJ, Greenberg SM and Ciomperlik MA. 2000. Effect of Host Plant on *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* Induced Mortality of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Environ. Entomol.* 29(5): 1048-1053

Prior C, Jollands P, Le Patourel G. 1988. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) to the cocoa weevil *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Invert. Pathol.* 52: 66-72

Pu XY, Feng MG, Shi CH (2005) Impact of three application methods on the field efficacy of a *Beauveria bassiana*-based mycoinsecticide against the false-eye leafhopper, *Empoasca vitis* (Homoptera: Cicadellidae) in the tea canopy. *Crop Prot.* 24:167–175

Qureshi JA, Stansly PA (2007) Integrated approaches for managing the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Florida. *P. Fl. St. Hortic. Soc.* 120: 110-115

Qureshi JA, Stansly PA (2009) Exclusion techniques reveal significant biotic mortality suffered by Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) populations in Florida citrus. *Biol. Control* 50(2):129-136.

Rombach MC (1989) Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) sympoduloconidia in submerged culture. *Entomophaga* 34:45-52.

Rombach MC, Aguda RM, Roberts DW (1988) Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in different liquid media and subsequent conidiation of dry mycelium. *Entomophaga* 33: 315-324.

Soper RS, Ward MG (1981) Production, formulation and application of fungi for insect control. In: Papavizas GC (ed) *Biological Control in Crop Production*, BARC Symposium No. 5 Allanheld, Osmum, Totowa, pp. 161-180.

Srinivasan R, Hoy MA, Singh R, Rogers ME (2008) Laboratory and Field Evaluations of Silwet L-77 and Kinetic Alone and in combination with Imidacloprid and Abamectin for the management of The Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina Citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida entomol.* 91(1): 87-100

Sterk G, Bolckmans K, de Jonghe R, de Wael L, Vermeulen J (1995) Side-effects of the microbial insecticide PreFeRal WG (*Paecilomyces fumosoroseus*, strain Apopka 97) on *Bombus terrestris*. *Meded. Fac. Landbouww. Rijksuniv.* 60: 713-717.

Sahayaraj K, Namasivayam SKR (2008) Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. *African J. Biotechnol.* 7 (12):1907-1910

SPSS. 2003. Statistical package for the social sciences. Base 12.0 user's guide. 368 p. SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA.

Subandiyah S, Nikoh N, Sato H, Wagiman F, Tsuyumyu S, Fakatsu T (2000) Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera, Psylloidea) in Indonesia. *Mycoscience* 41: 509-513.

Toledo AV, De Remmes LAMM, López LCC (2008) Host range findings on *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) in Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 43 (3-4): 211-220

Wang H, Chen G, Gong J, Liang K, Li X (2001) Occurrence of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama, in Taizhou, Zhejiang, and its control. *Plant Prot. Technol. Ext.* 21: 20-21.

Wraight SP, Carruthers RI, Bradley CA, Jaronski ST, Lacey LA, Wood P (1998) Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *J. Invertebr. Pathol.* 71, 217–226.

Vandenberg JD, Sandvol LE, Jaronski ST, Jackson MA, Souza EJ, Halbert SE (2001) Efficacy of fungi for control of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) in irrigated wheat. *Southwestern Entomol.* 26, 73–85.

Vega-Aquino P, Sánchez-Peña S and Blanco CA. 2009. Activity of oil-formulated conidia of the fungal entomopathogens *Nomuraea rileyi* and *Isaria tenuipes* against lepidopterous larvae. *J. Inv. Path.* 103(3):145-149

III. CONCLUSIONES

Se aislaron cepas infectivas a *Diaphorina citri* de suelo y de psílicos micosados de los estados de Nuevo León, Tamaulipas y Veracruz. De las cepas aisladas e identificadas, 46 fueron probadas en ninfas; la mayoría indujo porcentajes de mortalidad mayores al 80%.

Las cepas B6C (*Beauveria bassiana*), 6M11 (*Metarhizium anisopliae*) y IF8B19 (*Isaria fumosorosea*) provocaron mortalidad mayor al 90% a pesar de que las primeras dos cepas mencionadas fueron aisladas de suelo de huertas citrícolas y no de psílicos micosados.

Hirsutella citriformis, resultó muy difícil de inocular en medios sólidos y líquidos por su bajo crecimiento pero las conidias fueron infectivas a *Bactericera cockerelli* (psílido de la papa).

Cepas B6C, 6M11 cultivadas en arroz y medio líquido tuvieron rendimientos semejantes no mostrando diferencia significativa entre un método y otro (2.5×10^{12} esporas/kg de arroz y 3×10^{12} esporas/L de medio líquido) resultando el medio líquido mejor para IF8B19 ya que en granos de arroz crece lentamente y produce baja cantidad de esporas en contraste con las capas delgadas de blastosporas donde la esporulación se observó a las 96 horas de exposición a aireación.

Los hongos entomopatógenos producidos masivamente, se formularon en aceite agrícola Pure Spray foliar 22E, a pesar de que en bioensayos se probó aceite comercial puro de soya, este último ha resultado fitotóxico en aplicaciones de campo. Tween 20 al 0.025% se utilizó para formular las cepas de hongos entomopatógenos mencionadas no existiendo diferencia significativa entre las formulaciones utilizadas. IF8B19 indujo valores más altos de infección en Tween que en la formulación en aceite.

Los tratamientos se asperjaron por duplicado con un intervalo de 24 horas entre una y otra aplicación no existiendo diferencias significativas entre las aplicaciones.

Las cepas como factores no difieren significativamente pero respecto si respecto al testigo ($P = 4.2 \times 10^{-10}$). Así mismo, la interacción del hongo con la formulación muestra diferencias significativas ($P=0.04167$)

Beauveria bassiana (B6C) formulado en aceite provocó valores de hasta 90% de mortalidad, a pesar de que las temperaturas en la región fueron elevadas (38°C) y la humedad relativa fue baja (60%).

Hongos entomopatógenos pueden ser aplicados con éxito en ninfas y en adultos formulados en aceite mineral o en tween 20 como vehículos. Esta técnica además de ser eficaz, es económica y de manejo sencillo.

Cabe mencionar que se requieren más estudios en campo para evaluar mortalidad en psílidos con hongos entomopatógenos y formulaciones pero este trabajo da la pauta para seguir investigando la propagación natural de enemigos naturales que no disturben los nichos ecológicos y sean inocuos para el ambiente.

IV. LITERATURA REVISADA

- Alemán J. Baños H y Ravelo J. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad Huanglongbing: una combinación destructiva para la producción citrícola. Rev. Protección Veg. 22 (3): 154-165
- Al-Ghamdi, K. M. S. 2000. A field study on synchrony between the populations of citrus Psylla, *Diaphorina citri* (Kuwayama) [sic.] (Homoptera: Psyllidae) and its natural enemies in western Saudi Arabia. Bull. Fac. Agric., Cairo University 51: 227-238.
- Ahmed, S., Ahmad, N., Rasool K. R. 2004. Studies on Population Dynamics and Chemical Control of Citrus Psylla, *Diaphorina citri*. Int. J. Agri. Biol. 6(6): 970-73
- Avery PB, Hunter WB, Hall DG, Jackson MA, Powell CA, Rogers ME (2009) *Diaphorina citri* (Hemiptera: psyllidae) infection and dissemination of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: cordycipitaceae) under laboratory conditions. Florida entomol. 92 (4): 608-611
- Aubert B., J.M. Bove & J. Ettiène. 1980. La lutte contre lamadie du greening des agrumes á l'île de la Réunion. Resultats et perspectives. Fruits 35: 605-624.

- Aubert, B. 1987. *Trioza erytreae* 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.
- Baeza-Nahed, U. 2008. Parasitoides del minador de la hoja de los cítricos y del psílido asiático en la costa de Oaxaca. Tesis de Maestría en Ciencias. IPN. CIIDIR-Oaxaca. Oaxaca
- Bové, J.M., Chau M., Trung H.M., Bourdeaut J., and Garnier M., 1996. Huanglongbing (greening) in Viet Nam: Detection of *Liberobacter asiaticum* by DNA-hybridization with probe In2.6 and PCR-amplification of 16S ribosomal DNA. Proceedings of the 13th Conference, International Organization of Citrus Virologists. 258-266.
- Bové J.M., Teixeira, D.C., Wulff, N.A., Eveillard, S., Saillard, C., Bassanezi, R.B., Lopes, S.A., Yamamoto PT & Ayres AJ 2008 Several *Liberibacter* and *Phytoplasma* species are individually associated with HLB. Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing, Orlando, p.152-155.
- Burges, H. D., Hussey, N. M. 1971. *Microbial control of Insects and Mites*. London: Academic.

- Bustillo, A. 2001. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de entomología. Bogotá. 30-53
- Cabrera I., 2002. Presencia del hongo *Hirsutella citriformis* Speare sobre *Diaphorina citri* Kuw. (Homoptera: Psyllidae) en cítricos de Cuba. IV Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, Varadero, Cuba. Revista de Protección Vegetal 17 (3) p.199
- Cano E., Swezey S.L. 1992. Control biológico de la mosca prieta (*Aleurocanthus woglumi* ashby) (homoptera: aleyrodidae) en Nicaragua. Rev. Nica. Ent. 20:41-57
- Capoor, S. P., Rao, D. G., Visvanath S.M. 1974. Greening disease of citrus in the Deccan Trap country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. p. 43-49. In: Proc. 6th Conf. IOVC, Univ. Calif., Div. Agri. Sci., Richmond. 43-49
- Casique, V.R., Sánchez, P.S.R. 2010. Entomopathogenic fungi attacking the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in the Gulf citrus zone of Mexico. 58th Annual Meeting of the Southwestern Branch, Entomol. Soc. Am., SW-ESA, Cancun, Mexico.
- Castelán, A. J., 2010. HLB de los cítricos: principales acciones fitosanitarias para su control. Agroentorno. 47-48

<http://www.funprover.org/agroentorno/Noviembre/hlb.pdf> (Junio, 2011)

Cermeli, M., P. Morales, and F. Godoy. 2000. Presencia del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en Venezuela. Boletín Entomología Venezolana 15: 235-243.

Chien, C.C., Chiu, S.C., Ku S.C. 1989. Biological control of *Diaphorina citri* in Taiwan. Fruits 44(7-8): 404-407.

Chien, C.C., Chiu, S.C., Ku, S.C. 2001. Mass rearing and field release of an eulophid wasp. <http://www.agnet.org/library/tn/2001005/> (Junio, 2011)

Childers C. C. y Rogers M. E. 2005. Chemical control and management approaches of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera:psyllidae) in Florida citrus. Proc. Fla. State Hort. Soc. 118:49-53

Chiou-Nan, Chen. 1998: Ecology of the Insect Vectors of Citrus Systemic Diseases and Their Control in Taiwan. FFTC Publication Database; 1998. (Consultado: Junio 2011). Disponible en: <http://www.agnet.org/library/eb/459a/> (Jun, 2010)

Cobelo, L. (2005). Un citrus sin intrusos.

<http://www.clarin.com/suplementos/rural/2005/09/24/rA-00411.htm> (Mayo, 2010)

Coelho, M.V. y Marques, A. 2002 “Citrus greening” Uma bacteriose uarentenária que representa ameaça potencial à citricultura brasileira. Comunicado Técnico 58. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 4 pp.

Comunicaciones, notificaciones y noticias sobre HLB y su vector. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Noviembre de 2010.
<http://www.senasica.gob.mx/default.asp?Idioma=1&id=2505>

Coronado B., J.M, E. Ruiz C., S. Nicolaevna M. & G. Gaona García. 2003. *Tamarixia* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoide del psílido asiático de los cítricos en Tamaulipas, México, pp. 71-73. En: Memorias del XXVI Congreso Nacional de Control. Biológico. Noviembre de 2003, Guadalajara, Jalisco, México.

Dahiya, K.K., Lakra, R.K., Dahiya, A.S. and S.P. Singh, 1994. Bioefficacy of some insecticides against citrus psylla, *Diaphorina citri* kuwayama (Psyllidae: Hemiptera). Crop Res. Hisar, India, 8: 137-40

Da Graca, J.V. 1991. Citrus greening disease. Annu. Rev. Phytopathol. 29: 109-136.

- Da Graca, J.V., and L. Korsten. 2004. Citrus huanglongbing: Review, present status and future strategies, pp. 229-245. In: S.A.M.H. Naqvi (ed.) Diseases of fruits and vegetables, Vol. 1. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- Duperchy, E. 2003. Identification of up-regulated genes of the hyphomycete *Beauveria bassiana*, during the infection of *Leptinoptarsa dicemlineata*. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. 111 p
- Eilenberg, J. 2002. Biology of fungi from the order Entomophthorales. The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen, Denmark. 407
- Etienne J, Quilici S, Marival D, Franck A. 2001. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera, Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera, Eulophidae). *Fruits* 56: 307-315.
- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology* 23: 409-442.
- Ferron, P., Fargues, J., Riba, G. 1991. Fungi as microbial insecticides against pests. En: Arora, D.K., Ajello, L., Mukerji, K.G. (eds.) *Handbook of Applied Mycology*, Vol. 2: Humans, Animals and Insects, Marcel Dekker, New York, pp. 665-706.

- García Darderes, C.S. 2009. Distribución geográfica de *Diaphorina citri* kuwayama. Ministerio de la Producción. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Buenos Aires, Argentina.
- Garnier, M. and Bové J.M. 1993. Citrus greening disease. Proceedings of the 12th Conference, International Organization of Citrus Virologists. 212-219.
- Gerding M.G., France A. I., Gerding M. P., Rodríguez M. S. 2003. Formulación de biopesticidas con hongos entomopatógenos. INIA Tierra Adentro 48: 24-25
- Gillespie, A. 1988. Use of fungi to control pest of agricultural importance. In: Burge, M. (Ed) Fungi in biological control systems. Manchester University Press, Manchester, England. 269 p.
- Gonzales, C., M. Borges, D. Hernandez, Rodriguez, J. 2003. Inventory of natural enemies of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Cuba. Proc. International Soc. Citriculture 9: 859.
- Gravena, S., M. J. G. Beretta, P. E. B. Paiva, R. Gallao, and P. T. Yamamoto. 1996. Seasonal abundance and natural enemies of *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae) in citrus orchards of Sao Paulo State, Brazil, p. 414 In. J. V. da Graca, P. Moreno, and R. K. Yoomi (eds.), Proc. 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologist (IOCV). University of California, Riverside.

- Grafton, C. E. E., Godfrey, K. E., Rogers, M. E., Childers, C. C. and Stansly, P. A. 2006. Asian Citrus Psyllid. University of California. Agriculture and Natural Resources. Publication 825. ANR Communication Services. Oakland, California.
- Gottwald, T. R., da Graça, J. V., and Bassanezi, R. B. 2007. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2007-0906-01-RV.
- Hajeck, A.E. Y St. Leger, R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annual Review of Entomology, 39: 293-322.
- Hall, D. G. 2008. Biology, History and World Status Of *Diaphorina citri* I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (Candidatus Liberibacter spp) y el psilido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). Hermosillo, Sonora, Mexico.
- Halbert, S. E. and Manjunath, K. L. 2004. Asian citrus psyllids (sternorrhyncha: psyllidae) And greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. Florida entomologist 87(3): 330-352
- Heale, J. B.; Isaac, S.; Chan Dler, D. 1989. Prospect for strain improvement in entomopathogenic fungi. Pesticides Science 26:79-92

- Hung, T.H.; Hung, S.C.; Chen, C.N.; Hsu, M.H. y Su, H.J. (2004): Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector–pathogen relationships. *Plant Pathology*. 53: 96-102.
- Humber, R. A. 1981. An alternative view of certain taxonomic criteria used in the Entomophthorales (zygomycotina). *Mycotaxon* (13). USA: Mycotaxon, 1981. 191-240 p.
- Husain, M.A. and D. Nath. 1927. The citrus psylla (*Diaphorina citri*, Kuw.) (Psyllidae: Homoptera). *Memoirs of the Department of Agriculture India* 10: 1-27.
- INISAV. 1999. La enfermedad del enverdecimiento de los cítricos y su vector (*Diaphorina citri* Kuwayama). Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Vol. 5.
- Kiritani, K. and Su H.J. 1999. Papaya ring spot, banana bunchy top, and citrus greening in the Asia and Pacific region: occurrence and control strategy. *Japan Agricultural Research Quarterly* 33 (1): 23-30.

- Kouassi, M. 2001. Les possibilités de la lutte microbiologique emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. Universidad de Québec, Montreal, Canada. Vertigo. La revista en ciencias ambientales de la web. 2. Disponible en: www.vertigo.uqam.ca/.../mathias_de_kouassi.html (Junio, 2011)
- Lacey, L.A. Y Goettel, M. 1995. Current developments in microbial control of insects pests and prospects for the early 21st century. *Entomophaga*. 40: 3-27.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vail, P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biological Control*, 21: 230-248.
- Lecuona, R., Papierok, B., Riba, G. 1996. Hongos entomopatógenos. En: Lecuona, R. (Ed.) *Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plagas*. Mariano Talleres Gráficos, Buenos Aires, pp. 35-60.
- López L.V.; Hans Börje J. (2001) Biodiversidad del suelo: control biológico de nemátodos fitopatógenos por hongos nematófagos. *Cuaderno de Biodiversidad* 6: 12 - 15
- Ma Coy, C.W., Samson, R.A., Boucias, D.G., Microbial insecticides, Part A: Entomogenous protozoa and fungi. En: Ignoffo, C.M. y Mandava, N.B. (Eds.). *Handbook of Natural Pesticides*, Vol. 5. CRC Press, Boca Raton, FL, 1988. pp. 151-236.

- Marutani H. M., Hunter W. B., Hall D. G., 2009. Establishment of Asian Citrus psyllid (*Diaphorina citri*) primary cultures. In vitro cellular developmental biology Animal 45 (7): 317-320
- Meyer J. M., Hoy M. A., Boucias D. G. 2007. Morphological and molecular characterization of a Hirsutella species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. Journal of Invertebrate Pathology. 95(2): 101-109
- Michaud, J. P. 2001. Numerical response of *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae) to infestations of Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) in Florida. Florida Entomol. 84: 608-612.
- Michaud, J. P. 2002. Biological control of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Florida: a preliminary report. Entomol. News. 113 (3): 2169-223.
- Michaud J. P. 2004. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in Central Florida. Biological Control 29: 260-269.
- Michaud, J. P., and L. E. Olsen. 2004. Suitability of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, as prey for ladybeetles. BioControl 49: 417-431.

- Moll, J. N., and van Vuuren, S. P. 1977. Greening disease in Africa. Prot. Intl. Soc. Citricult. 3:903-912.
- Monzon, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. (63): 95-103
- Nava, D. E., Torres, M. L. G., Rodrigues, M. D. L., Bento, J. M. S., Parra., J. R. P. 2007. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. J. Appl. Entomol. 131: 709-715.
- Orozco, S. S. 1995. Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México, Universidad Autónoma Chapingo, México. 150
- Pell, J.K., Eilenberg, J., Hajek, A.E., Steinkraus, D.C. 2001. Biology, ecology and pest management potential of entomophthorales. En: Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N. (Eds.). Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. CABI Publishing, Wallingford, UK. 71-153.
- Pruthi, H. S. and H. N. Batra. 1938. A preliminary annotated list of fruit pests of the North-West Frontier Province. Misc. Bull. Imp. Council Agric. Res. India. 19: 10-12.

- Pucheta D. M., Flores M.A., Rodríguez N. S., de la Torre M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*. 31(12): 856-860.
- Quesada-Moraga, E. 2002. Los hongos entomopatógenos en el control de las plagas de insectos. *Phytoma España*, 144: 41-48.
- Quesada-Moraga, E. Y Santiago-Álvarez, C. 2000. Rearing and breeding of the Mediterranean locust *Doclostaurus maroccanus* under laboratory conditions. *Journal of Applied Entomology*. 125 (3): 121-124.
- Rae DJ, Liang WG, Watson DM, Beattie GA, Huang MD. 1997. Evaluation of petroleum spray oils for control of the Asian citrus psylla, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae), in China. *Intern J Pest Management*. 43(1):71-75.
- Rivero Aragon, A., y H. Grillo-Ravelo. 2000. Natural enemies of *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) in the central region of Cuba. *Centro-Agricola* 27 (3): 87-88 (solo resumen).
- Roberts, D.W. Y Humber, R.A. 1981. Entomogenous fungi. En: Cole, G.T. y Kendrick, B. (Eds.) *Biology of Conidial Fungi*. Academic Press, New York.

- Roistacher, c.N. 1991. Techniques for biological detection of specific citrus graft transmissible diseases. In C.N. Roistacher, Graft-Transmissible diseases of citrus. Rome:FAO, 1991. 35-45
- Roy, E.H, Steinkraus D. C., Eilenberg J., Hajek A.E., Pall J. K. 2006. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annu Rev Entomol* 51: 331-57
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).2011. Plagas Cuarentenarias de los cítricos. Huanglongbing <http://www.senasica.gob.mx/?id=1013> (Septiembre, 2011)
- Samson, R.A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Stud. Mycol.* 6: 1-119.
- Ruiz C., E., J.M. Coronado B. & S.N. Myartseva. 2004. The Asian citrus psyllid in Mexico. Annual Meeting of the Entomological Society of America. Salt Lake City, UT
- Sahu, S.R. and S.K. Mandal, 1997. Population dynamics of citrus psylla, *Diaphorina citri* kuwayama (Psyllidae: Hemiptera). *J. Interacadem.*, 1: 329-32

- Shah, P.A. Y Goettel, M.S. 1999. Directory of Microbial Control Products and Services. Society for Invertebrate Pathology, Division of Microbial Control, Gainesville, Florida. [http:// www.sipweb.org/directory.htm](http://www.sipweb.org/directory.htm)
- Shivankar, V.J., C.N. Rao, S. Shyam and S. Singh, 2000. Studies on citrus psylla, *Diaphorina citri* kuwayama: a review. *Agric. Rev.*, 21: 199-204
- Tanada, Y., Kaya, H. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press. San Diego, California. (USA). 666 p.
- Trujillo-Arriaga J. 2010. Situación actual, regulación y manejo del HLB en México. 2º Taller internacional sobre el Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos. Mérida, Yucatán, México.
- Tsai J.H., and Y.H. Liu. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. *J. Economic Entomology* 93(6):1721-1725.
- Urtubia I. H., France A. I., 2007. Formulación de hongos entomopatógenos para control de plagas en agricultura. INIA Tierra Adentro, Noviembre-Diciembre: 46-49
- Varela,F.S.E.,Silva,A.G.L.Svetlana N. M 2006. Enemigos naturales de la mosca prieta de los cítricos (*Aleurocanthus woglumi* Ashby) en Tamaulipas. X Congreso Internacional de Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. pag. 39-40.

- Vélez, P.A., Posada, F.J., Marin, P., Gonzalez, M.T., Osorio, E., Bustillo, A.E. (1997).
Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatogénicos.
Centro Nacional de Investigaciones del café. Boletín Técnico No. 17 p.37.
- Volcy, C., Pardo, V. 1994. Principios de Micología. Centro de Publicaciones, Universidad
Nacional de Colombia. Sede Medellín. 141 p.
- Wang, L.Y., Hung, S.C., Hung T.H., Su, J. 1996. Population fluctuations of *Diaphorina
citri* kuwayama and incidence of citrus liqubin in citrus orchards in chaiyi area. *Pl.
Protect. Bull.*, Taipei, 38: 355-65
- Wenninger, E. J. and D. G. Hall. 2007. Daily timing of any age at mating in the Asian
citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Fla. Entomol.* 90: 715-722.
- Wenninger, E.J., D.G. Hall, and R. W. Mankin. 2009. Vibrational communication between
the sexes in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Annals Entomol. Soc.
America.* 102 (3): 547-555
- Wong, H. 2003. Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*:
Insect-cuticle degrading enzymes and Development of a new selection marker for

fungal transformation. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. 147.

Wraight, S.P., Jackson, M.A., Kock, S.L. 2001. Production, Stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. En: Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N. (Eds.). *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing, Wallingford, UK. 253-287.

Xie, P.H., C. Su, and Z. G. Lin, Z.G. 1988. A preliminary study on an entomogenous fungus [*Verticillium lecanii*] of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hom.: Psyllidae). *Chin. J. Biol. Control*. 4 (2): 92.

Xu, C. F., Y. H. Xia, K. B. Li and C. Ke. 1988. Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: Timmer, L. W., Garnsey, S. M., and L. Navarro (eds.), *Proceedings of the 9th Conference of International Organization of Citrus Virologists*. International Organization of Citrus Virologists, Valencia, Spain, pp. 100-108.