

CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS, AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE *Diaphorina citri*

LIVIER GUIZAR GUZMÁN

TESIS

Presentada como requisito parcial

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

Saltillo, Coahuila, México.

Junio de 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO
CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS, AGENTES DE
CONTROL BIOLÓGICO DE *Diaphorina citri*

TESIS
Presentada por:


LIVIER GUIZAR GUZMÁN

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. OSWALDO GARCÍA MARTÍNEZ

Asesor


DR. JOSÉ ISABEL LÓPEZ ARROYO


DR. FERNANDO RUÍZ ZARATE
Subdirector de Postgrado

Saltillo, Coahuila, México. Junio de 2013

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco al Dr. Sergio René Sánchez Peña, por haberme aceptado como su alumna y haberme ayudado en todo momento a ser mejor alumna e investigadora. Por todos esos momentos que me hizo sufrir y por otros tantos que me hizo reír. Quiero que sepa lo mucho que agradezco que siempre exija lo mejor de mí.

Al Dr. J. Isabel López Arroyo, por su valiosa participación en este proyecto y los conocimientos aportados.

Al Dr. Oswaldo García Martínez, por su disposición y amabilidad cada vez que me acerqué a él.

Al Dr. Michael J. Bidochka, por aceptarme en su laboratorio y permitirme aprender, conocer y trabajar en un área que jamás pensé sería mi favorita.

Al Dr. Israel Padilla Gómez, por enseñarme todo lo que necesité en el área molecular, por todas la veces que me acompañó a Tim Horthons y por ser un gran amigo, divertido y comprensivo.

Al Dr. Ernesto Chávez García, por su ayuda incondicional para todas mis salidas a campo, estancias, etc.

A la Dra. Rosa Ma. García Quiñones, por su apoyo y siempre buena disposición para ayudarme.

Al M.C. Salvador Ordaz Silva, por siempre apoyarme en todo, resolviendo dudas, compartiendo material y experiencia, pero sobre todo por ser un gran amigo.

Al Departamento de Parasitología y a todas las personas que trabajan ahí por su gran atención brindada.

Al proyecto FONSEC SAGARPA-CONACYT 2009-108591 “Manejo de la enfermedad Huanglongbing (HLB) mediante el control de poblaciones del vector *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae), el psílido asiático de los cítricos”.

A CONACYT por el apoyo económico durante mi maestría y estancia.

DEDICATORIAS

A mi madre Concepción Guzmán García (Shelly) por siempre apoyarme y animarme a ser mejor, por enseñarme a valerme por mí misma, a ser fuerte, gracias por tu ejemplo de cómo ser una gran mujer.

Corina mi hermana tan querida, quien no solo escucha todos mis dramas, si no que me ayuda con cada cosa que no se sobre diseño y cosas de computadoras ¡Eres lo máximo! Te adoro con todo mi corazón, muchas gracias.

A mi otra querida hermana Mitzi, por haberme mandado fotos, videos y muchos ánimos para seguir adelante, y a mis sobrinos Valeria y Sebastian, quienes provocan en mí el deseo de ser mejor cada día, y poder darles un buen ejemplo, para que se sientan orgullosos. Espero sigan mis pasos eh...

A mis amigas Mel, Lucio y Lilo, por más de 20 años de amistad, de risas, de lágrimas, de bares y pijamadas, de sonidos nasales incomprensibles para los demás, de viajes, y de tantos recuerdos que siempre me hacen sonreír ¡Las quiero mucho!

A mi amigo querido Oscar Enciso, por siempre escucharme, apoyarme cuidarme y ponerme en mi lugar, cada día desde que lo conocí.

A mi Juan de Dios Hernández Quintero, porque gracias a él decidí estudiar esta maestría, gracias a él tuve un hogar feliz a donde llegar después de tanto trabajar, gracias por todos los random comments y por hacerme reír tanto roomie.

A mis compañeros y amigos Desireê, Epifanio, Lalo, Inés, Eva y Violeta por todas las aventuras que pasamos, por todos los chistes malos que contamos, por las coreografías de RGC que tanto disfrutamos, por todas las canciones que cantamos a todo pulmón, gracias por llevarse el estrés de mi vida cada vez que nos reuníamos. Fabiola Garrido Cruz mereces un reconocimiento especial, porque sin ti estos 2 años de duro trabajo, se hubieran sentido como 20, gracias Faby.

Resumen

CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS, AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE *Diaphorina citri*

COMPENDIO

POR:

LIVIER GUIZAR GUZMÁN

MAESTRO EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SALTILLO, COHAUILA. JUNIO DE 2013

Dr. Sergio René Sánchez Peña -Asesor-

Palabras clave: *Diaphorina citri*, *Entomophthora* spp., nuevo hospedero, *Metarhizium* spp., especies moleculares.

Diaphorina citri Kuwayama (Hemiptera: Liviidae antes Psyllidae)), es de las plagas más importantes de los cítricos por ser vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, la cual causa la enfermedad llamada Huanglongbing; su presencia en México, representa una seria amenaza para 526 mil hectáreas de cítricos. *D. citri* es atacada por diversas especies de hongos entomopatógenos, incluyendo a las del género *Metarhizium* (Ascomycota: Cordycipitales), que son hongos del suelo, patógenos facultativos de insectos de más de 200 especies, incluyendo *D. citri*. En el presente estudio, en busca de especímenes infectados con hongos entomopatógenos, se colectaron adultos vivos de este insecto en los municipios de Papantla y Tlapacoyan, en el Estado de Veracruz, México, obtenidos de limón persa (*Citrus latifolia*) y limonaria (*Murraya paniculata*), las muestras obtenidas se mantuvieron en laboratorio en cámara húmeda. Se detectó e identificó una especie del género *Entomophthora* Cohn *sensu stricto* (Entomophthoromycota: Entomophthorales) infectando 1.4% de insectos adultos. *D. citri* es un nuevo registro de hospedero a nivel mundial para este género de hongos entomopatógenos.

Los caracteres utilizados para la identificación y clasificación de especies de los hongos entomopatógenos (Ascomycota: Hypocreales) son ambiguos la mayoría son casi exclusivamente anamórficos, lo que complica definir la diversidad genética intra- e interespecífica. Estudios moleculares recientes han revelado que *M. anisopliae* es un complejo de especies que contiene al menos nueve diferentes taxones. En este estudio se reporta por primera vez la presencia de *M. robertsii* en los Estados de Coahuila, Nuevo León, Veracruz y San Luis Potosí y *M. brunneum* “alterno” en Tabasco, Chiapas, Colima y Tamaulipas, México.

Abstract

**CHARACTERIZATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ACTING AS
BIOLOGICAL CONTROL AGENTS OF *Diaphorina citri***

DIGEST

BY:

LIVIER GUIZAR GUZMÁN

MASTER IN SCIENCE OF AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SALTILLO, COAHUILA. JUNE 2013

Keywords: *Diaphorina citri*, *Entomophthora* spp., new host, *Metarhizium* spp.,
molecular species.

Diaphorina citri Kuwayama (Hemiptera: Liviidae (before Psyllidae)), is one of the most important citrus pests; such insect is a vector of the bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, which is the putative agent of the disease called Huanglongbing. Its occurrence to Mexico, represents a serious threat to 526 000 hectares of citrus. *D. citri* is attacked by various species of entomopathogenic fungi, including the genus *Metarhizium* (Ascomycota: Cordycipitales), which is a soil fungus, and insect pathogen of over 200 species, including *D. citri*. In the present study, live adults of this insect living in the municipalities of Papantla and Tlapacoyan, in the State of Veracruz, Mexico were collected for infection with entomopathogenic fungi, obtained from Persian lime (*Citrus latifolia*) and orange Jasmine (*Murraya paniculata*), samples were kept in humid chambers in the laboratory. A species of *Entomophthora sensu stricto* Cohn (Entomophthoromycota: Entomophthorales) was detected and identified infecting 1.4% of adult insects. *D. citri* is a new host world record for this genus of entomopathogenic fungus.

Characters used for identification and classification of species of entomopathogenic fungi (Ascomycota: Hypocreales) are ambiguous, since most are almost exclusively anamorphic, complicating to define intra- and interspecific genetic diversity. Recent molecular studies have revealed that *M. anisopliae* is a species complex that contains at least nine different species many morphologically identical. In this study, we report for the first time the presence of *M. robertsii* in the States of Coahuila, Nuevo Leon, Veracruz and San Luis Potosi and *M. brunneum* "alternate" in Tabasco, Chiapas, Colima and Tamaulipas, Mexico.

ÍNDICE DE CONTENIDO

I. CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 El Psílido Asiático de los Cítricos <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama.....	2
1.1.1 Clasificación taxonómica	2
1.1.2 Morfología.....	2
1.1.2.1 Adultos	2
1.1.2.2 Ninfas.....	3
1.1.2.3 Huevecillos.....	4
1.1.3 Biología y ecología.....	5
1.2 Origen y distribución mundial de <i>Diaphorina citri</i>	8
1.3 Importancia de HLB en México y el mundo	9
1.4 Presencia de HLB en México	10
1.5 Síntomas de HLB	11
1.5.1 Diagnóstico de HLB	12
1.5.2 Transmisión y propagación de la bacteria	13
1.5.3 Plantas hospedantes	13
1.5.4 Daño directo	14
1.5.5 Daño indirecto	14
1.6 Métodos de control para el psílido asiático de los cítricos <i>Diaphorina citri</i>	14
1.6.1 Control químico.....	14

1.6.2 Control biológico	15
1.6.2.1 Depredadores	15
1.6.2.2 Parasitoides	16
1.6.2.3 Hongos entomopatógenos	17
1.7 Proceso de infección de hongos entomopatógenos	19
1.8 Biología y clasificación de los hongos entomopatógenos	20
2.1 Objetivos	23
2.1.1 Objetivo General.....	23
2.1.2 Objetivos específicos.....	23
2.2 Hipótesis	23
II. CAPITULO 2 ARTÍCULO 1	24
III. CAPITULO 3 ARTÍCULO 2	36
IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	49
V. LITERATURA CITADA	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Psílidoasiático de los cítricos <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama.....	3
Figura 2 Estadios ninfales de <i>Diaphorina citri</i>	4
Figura 3 Huevos del psílido asiático de los cítricos <i>Diaphorina citri</i>	5
Figura 4 Ninfa de <i>Diaphorina citri</i> secretando mielecilla.....	6
Figura 5 Distribución mundial de <i>Diaphorina citri</i>	8
Figura 6 Distribución de Huanglongbing (HLB) en México.....	10
Figura 7 Síntomas del Huanglongbing en limón.....	11
Figura 8 Depredador <i>Olla v-nigrum</i> (Coleoptera: Coccinellidae).....	16
Figura 9 Avispa <i>Tamarixia radiata</i> (Waterson)(Hymenoptera: Eulphidae) ninfas de <i>Diaphorina citri</i>	17
Figura 10 Hongos entomopatógenos sobre <i>Diaphorina citri</i>	18
Figura 11 Estructura y composición de la cutícula del insecto y esquema de la penetración por hongos entomopatógenos.....	19

CAPÍTULO 1

Introducción general

1.1 El Psílido Asiático de los Cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama

1.1.1 Clasificación taxonómica

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Suborden: Sternorrhyncha

Superfamilia: Psylloidea

Familia: Liviidae

Género: *Diaphorina*

Especie: *Diaphorina citri* Kuwayama

1.1.2 Morfología

1.1.2.1 Adultos

Los adultos de *Diaphorina citri* Kuyama (Hemiptera: Liviidae (Burckhard & Ouvrard 2012) (antes Psyllidae)). Cuerpo marrón jaspeado, recubierto de polvo ceroso, cabeza marrón con ojos rojos. Mide de 3-4 mm de longitud (Halbert & Manjunath 2004), sin embargo Hall (2008), indica medidas de 2.7 a 3.3 mm

de largo con alas café moteadas. Las antenas presentan el ápice negro con dos manchas marrón claro en la parte media. Las alas son más anchas que el tercio apical (Cermeli *et al.*, 2000). Se les puede reconocer por la posición que adoptan durante la alimentación, ya que 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 & Manjunath 2004).

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



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

1.1.2.2 Ninfas

Pasa por cinco instares ninfales muy parecidos que varían en tamaño después de cada muda. Dependiendo del del instar ninfal, la longitud varía desde 0.25 hasta 1.7 mm y generalmente son de color amarillo naranja (Tang *et al.*, 1984). Se alimentan exclusivamente de los brotes jóvenes, sobre todo los primeros tres instares. En el transcurso de los días aumentan de tamaño, se mueven lentamente sobre la planta hospedante dejando como huella la cera que expelen por la estructura anal. No presentan esbozos alares y la coloración

es más intensa. En los dos últimos instares las ninfas migran hacia otros brotes jóvenes. Las ninfas mayores (tercer, cuarto y quinto estadio) presentan los esbozos alares, que aumentan su tamaño dependiendo de la edad. El último instar se caracteriza por poseer los esbozos alares de mayor tamaño. Durante la alimentación de las ninfas es común observar secreciones cerosas, signo que facilita la detección de la plaga.(Chiou-Nan *et al.*, 1998; Etienne *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2005).



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

1.1.2.3 Huevos

Los huevos recién ovipositados son de color amarillo mate y se tornan amarillo naranja a medida que se acerca el momento de la eclosión, tienen forma almendrada y son colocados en el brote joven. La cantidad de huevos depositados depende de la planta hospedera, por ejemplo, en toronja se ha encontrado una media de 857 huevos por hembra, mientras que en limón es de 572. Cuando la temperatura es de 25°C, la eclosión de los mismos ocurre a los 4 días (Chiou-Nan *et al.*, 1998) (Liu *et al.*, 2000).



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

1.1.3 Biología y ecología

Los adultos se alimentan en el envés de las hojas (Grafton-Cardwell *et al.*, 2006), aunque cuando ocurren altas poblaciones, se les puede observar formando grupos tanto en el haz como en el envés. Los adultos se muestran activos cuando son molestados y realizan saltos cortos de una hoja a otra (Etienne *et al.*, 2001). Viven entre uno y dos meses dependiendo de la temperatura y la planta hospedante en la que se alimenten (Liu *et al.*, 2000). Se señala una longevidad promedio para la hembra de 39.6 a 47.5 días a una temperatura de 25°C, con la característica particular de que pueden vivir por varios meses esperando hasta que llegue el periodo de brotación de las plantas hospedantes. Los apareamientos se realizan después de uno a tres días de la emergencia y en condiciones favorables, caracterizadas por la presencia de brotes en las plantas. Un día después del apareamiento comienza la oviposición (Etienne *et al.*, 2001). El abdomen de la hembra grávida toma una coloración amarillo naranja brillante. Los adultos se pueden encontrar en condiciones naturales durante todo el año, depositando huevos dondequiera que existan brotes disponibles. Se desarrollan exclusivamente sobre plantas de la familia *Rutaceae*, con preferencia por los cítricos y *Murraya* spp. El periodo de oviposición es de 17 a 60 días (www.eppo.org2007) (SENASA 2006).

Las ninfas se alimentan exclusivamente de los brotes jóvenes, sobre todo los primeros tres instares. Se plantea que las ninfas del primer estadio son diminutas, de color amarillo claro, con tres pares de patas caracterizadas por el grosor que presentan y en el extremo terminal se observan dos setas conspicuas, rodeando la garra en que termina el tarso. En el transcurso de los días aumentan de tamaño, se mueven lentamente sobre la planta hospedante. No presentan esbozos alares y la coloración es más intensa(Chiou-Nan 1998; Etienne *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2005).

El desarrollo desde huevo hasta adulto requiere de 16 a 17 días a una temperatura de 25°C. A causa de la corta duración del ciclo del desarrollo, pueden observarse rápidamente numerosas ninfas que dan lugar a los adultos, los cuales se presentan en una menor cantidad, en virtud de que se mueven hacia otros brotes para depositar sus huevos luego de la cópula y continuar la infestación. Otro elemento a resaltar es que existe sincronización entre el desarrollo del brote y el ciclo de vida de estos insectos, por lo que los brotes en crecimiento constituyen un factor fundamental en el comportamiento de la especie (Fernández *et al.*, 2005(2)).



Figura 4 Ninfa de *Diaphorina citri* secretando mielecilla (fotografía por Livier Guizar UAAAN 2013).

Se carece de evidencias de diapausa en *D. citri* y sus poblaciones declinan en los periodos en que las plantas no están en brotación. El rango de temperaturas más favorable es entre 22 y 29°C. Tanto las altas como las bajas temperaturas son perjudiciales para el incremento de su densidad poblacional (Atwal *et al.*, 1968). El insecto no tolera humedades cercanas al punto de saturación debido a que esto favorece las epizootias fúngicas a las cuales las ninfas son muy susceptibles (Albert *et al.*, 2004).

En periodos secos los adultos son numerosos, mientras que las ninfas usualmente están ausentes (EPPO 2007). Las poblaciones pueden alcanzar niveles extremadamente elevados, lo cual se ha podido constatar al aplicar un producto químico a la planta y colocar un papel blanco debajo del árbol para coleccionar los psílidos muertos. Con este método se han registrado promedios de 41,561 adultos por árbol (Albert *et al.*, 2004).

1.2 Origen y distribución mundial de *Diaphorina citri*

D. citri es una plaga que ataca a todos los cítricos así como a los géneros cercanos a los cítricos (Grafton-Cardwell *et al.*, 2000). Este insecto fue descrito por primera vez en Taiwán en 1907 (Pluke *et al.*, 2005). Según lo señala Hall (2008), su origen geográfico es en el sur de Asia y muy probablemente de la India. Hoy día está ampliamente distribuido en muchas áreas citrícolas del mundo (Figura 5). El psílido asiático de los cítricos se ha reportado afectando los cítricos en China, India, Myanmar, Taiwán, Islas Filipinas, Malasia, Indonesia, Sri Lanka, Pakistán, Tailandia, Nepal, Hong Kong, Islas Ryukyu, Afganistán, Arabia Saudita, Reunión y Mauricio. En el Continente Americano fue detectado por primera vez en Brasil en 1942 (Costa Lima 1942, citado por Mead 1977). Para 1990, *D. citri* se encontró en la isla de Guadalupe, Isla de Abaco,

Isla Grand Bahama y las Islas Caimán (Halbert & Núñez 2004). En Florida el psílido asiático de los cítricos se detectó en 1998 (Tsai & Liu 2000). Posteriormente en 2001, fue encontrado en República Dominicana, Cuba (Halbert & Núñez 2004). En México *D. citri* se reportó por primera vez en el año 2002, en árboles de cítricos del estado de Campeche (Thomas 2002, citado por López-Arroyo *et al.*, 2005). En el año 2003, se registró simultáneamente en los estados de Nuevo León y Tamaulipas (López-Arroyo *et al.*, 2004, 2005; Ruiz *et al.*, 2005). En el 2004, se informó de la presencia de la plaga en los estados de Colima, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Yucatán (López-Arroyo *et al.*, 2005) y para el 2008 se le reportó también en Baja California (López-Arroyo *et al.*, 2008) y con ello el insecto terminó por invadir todos los estados productores de cítricos de nuestro país.

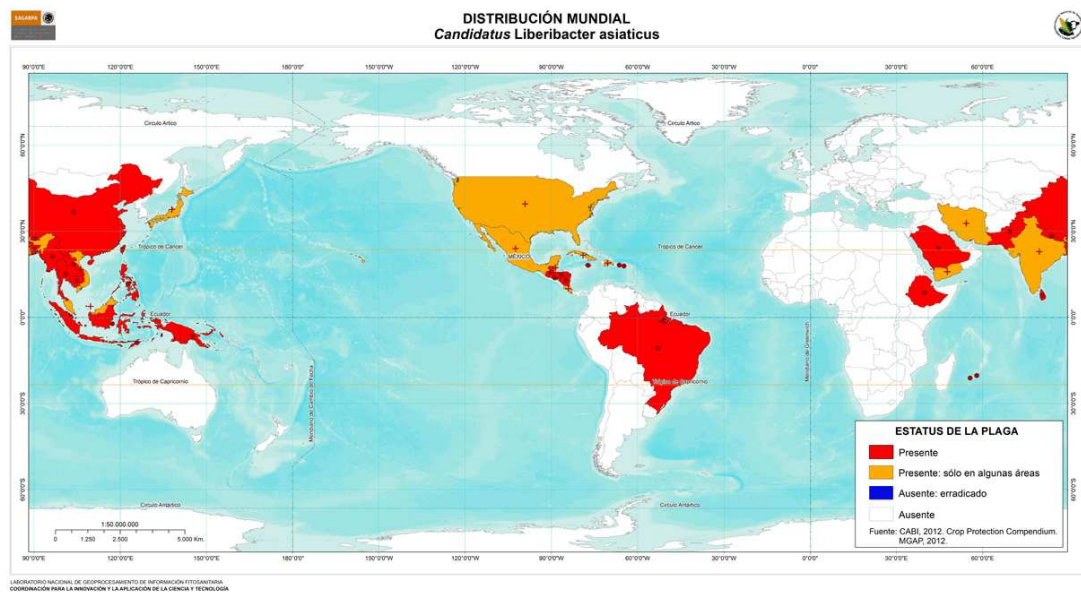


Figura 5 Distribución mundial de *Diaphorina citri*, vector de la bacteria asociadas a síntomas del Huanglongbing (SAGARPA 2013).

1.3 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. (Bové *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 rutáceas entre ellas, el limón, la naranja, toronja y limonaria (que es su principal hospedero); a la fecha se carece de tratamientos curativos para la enfermedad y los árboles infectados mueren en el transcurso de 5 a 8 años (Halbert & Manjunath 2004).

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.

1.4 Presencia de HLB en México

A la fecha (Marzo 2013) el HLB se encuentra en los siguientes estados: Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Chiapas, Campeche, Colima, Baja California Sur, Hidalgo, Tabasco, Guerrero, Yucatán y Quintana Roo. El mapa (Figura 6) muestra la distribución de HLB en México.



Figura 6 Situación fitosanitaria nacional HLB (SENSICA 2013).

1.5 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 con una infestación prolongada, el árbol pierde

follaje; en el caso de los frutos, su desarrollo se detiene, en algunos casos los frutos se deforman, presentan una coloración atípica y las semillas son abortadas; después de un tiempo, el árbol muere.

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.

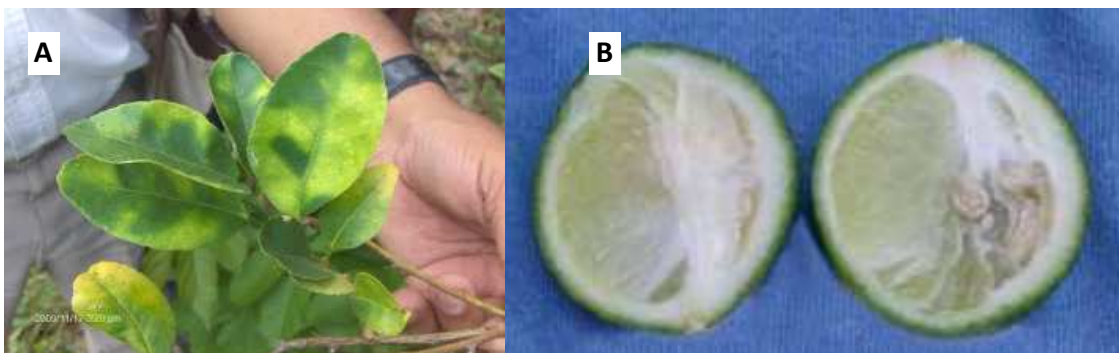


Figura 7 A) Síntomas en limón, se observa clorosis y amarillamiento difuso (SENASICA 2011). B) Síntomas de HLB en frutos (Fotografía por Kiritani & Su 1999).

1.5.1 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 & Bové 1993; Bové *et al.*, 1996).

1.5.2 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). 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) reportan 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.

1.5.3 Plantas hospedantes

Existen numerosas observaciones acerca de los hospedantes preferenciales de *D. citri*, en un estudio comparativo a nivel de laboratorio, donde se probaron las especies *Murraya paniculata* L. (limonaria), *Citrus*

jambhiri Luch (limón rugoso), *Citrus aurantium* L. (naranja amarga) y *Citrus paradisi* MacFad (toronja). *C. paradisi* resultó ser el mejor hospedante, mientras que entre las otras especies no se encontraron diferencias significativas.

Los daños causados por este insecto se pueden clasificar en directos, al alimentarse de la planta y daños indirectos cuando transmite la bacteria causante de la enfermedad denominada Huanglongbing (Chien *et al.*, 1996).

1.5.4 Daño directo

El insecto durante su alimentación extrae grandes cantidades de savia y produce abundante mielecilla que cubre la superficie de la hoja y sirve de sustrato para el crecimiento de hongos productores de fumagina. Durante su alimentación inyectan toxinas a la planta que detienen el crecimiento de los brotes y deforman las hojas (Michaud 2004). Una sola ninfa alimentándose por menos de 24 horas es capaz de provocar una malformación de la hoja tanto joven como madura. Con frecuencia las infestaciones iniciales del *D. citri* ocurren localizadas en determinados árboles cítricos. Los árboles maduros suelen tolerar los daños, debido a que la pérdida de hojas es mínima si se le compara con el tamaño de la copa.

1.5.5 Daño indirecto

El principal daño causado por *D. citri* es producto de su habilidad para transmitir eficientemente la bacteria llamada *Candidatus Liberibacter asiaticus*, causante del Huanglongbing (EPPO, 2007) (Grafton-Cardwell *et al.*, 2006). *D. citri* puede transmitir el patógeno con una eficiencia de sólo el 1%, asignándose este rol a las ninfas de cuarto y quinto instar y a los adultos, quienes adquieren

la bacteria patógena después de haberse alimentado de una planta enferma durante 30 minutos o más (Chiou-Nan 1998).

1.6 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 plantas sanas (Chen 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 la campaña contra el HLB de los cítricos tiene el objetivo de explorar para la detección de síntomas y eliminar oportunamente las plantas infectadas por el HLB para de esta manera evitar la presencia de brotes que contaminen el resto de las plantas. Muestrear psílicos para diagnóstico asintomático y de esta manera conocer si el vector está siendo portador de la bacteria, a pesar de que no se observen síntomas en campo. (Villagomez-Almanza *et al.* 2010)

1.6.1 Control químico

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

Muchos insecticidas sintéticos han sido probados contra este psílido; Organofosforados: clorpirifos etil, dimetoato y malatión; Pirazoles: fenpyroximate; Piretroides: bifentrina, cipermetrina, bifentrina+ zetacipermetrina; Neonicotinoides: thiametoxan, imidacloprid+ betacielutrina (Cortez-Mondaca 2013) Los aceites minerales y de petróleo son 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. Cuando se asperjan árboles no infestados por el psílido, se observan bajos niveles poblacionales posteriormente, lo cual puede deberse a la inhabilitación de los sitios de oviposición. 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 9 días (Rae *et al.*, 1997). El uso de los aceites tiene una serie de ventajas con respecto a los plaguicidas convencionales, debido a que son menos agresivos a los enemigos naturales, los insectos no desarrollan resistencia, no resultan tóxicos a los vertebrados y se degradan fácilmente en el ambiente (Beattie *et al.*, 1993), haciendo que su uso sea más sostenible a largo plazo (Rae *et al.*, 1997).

1.6.2 Control biológico

1.6.2.1 Depredadores

El psílido es comúnmente atacado por mariquitas (Coleoptera: Coccinellidae); estos depredadores han sido señalados como importantes agentes de control biológico de *D. citri* entre las que destacan *Harmonia axyridis* Pallas, *Ola v-nigrum* Mulsant, *Exochomus children* Mulsant, *Cycloneda sanguinea* L., *Curinus coeruleus* Mulsant, *Coccinella septempunctata* L., *C. rependa* Thunberg, *Cheilomenes sexmaculata* Fab., *Chilocorus nigrita* (Fab.), *Scymnus* spp. (Husain & Nath 1927; Aubert 1987; Gravena *et al.*, 1996; Michaud & Olsen 2004), *Brachiacantha decora* e *Hippodamia convergens*

(Inifap 2010); Sírfidos (Diptera: Syrphidae), crisopas (Neuroptera: Chrysopidae, Hemerobiidae) y arañas (Araneae) (Aubert 1987, Michaud 2001, 2002, 2004, González *et al.* 2003). Algunas especies de arañas pueden ser depredadores importantes de *D. citri* (Alghamdi 2000; Michaud 2002).



Figura 8 Depredador *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae) muy común en México (Fotografía por CNRCB Colima, México).

1.6.2.2 Parasitoides

Tamarixia radiata (Waterson) (Hemiptera: Eulophidae) es una especie originaria de la India, que ha sido introducida en las Islas Reunión controlando con éxito al psílido asiático de los cítricos en dicha localidad (Chien *et al.* 2006). Sin embargo la introducción del parasitoides 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 & Manjunath 2004). *T. radiata* es un ectoparásito cuyas larvas se alimentan a expensas de las ninfas de *D. citri* debajo de su cuerpo, pupan ahí mismo 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.

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; Chien *et al.* 1989; Etienne *et al.*, 2001).



Figura 9 A) Avispa *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulphidae) en ninfas de *D. citri*. (Fotografía por FFTC Taiwan). B) Emergencia de adultos del parasitoide *Tamarixia radiata*, de ninfas momificadas de *D. citri*. (Fotografía por University of Florida).

1.6.2.3 Hongos entomopatógenos

Entre las especies de hongos entomopatógenos que atacan al *D. citri* de manera natural se encuentran: *Isaria fumosorosea* Wize; *Hirsutella citriformis* Speare; *Lecanicillium lecanii* (Samson 1974; Xie *et al* 1988; Subandiyah *et al.* 2000; Rivero-Aragón & Grillo-Ravelo 2000; Etienne *et al.* 2001; Cabrera 2002; Meyer *et al.* 2004; Meyer *et al.*, 2007). Etienne *et al.* (2001), señaló que es común observar *H. citriformis* controlando psílidos cuando la humedad relativa fuese mayor al 80%. En observaciones realizadas durante el período Septiembre-Octubre 2009 por la UAAAN, se encontraron adultos de *D. citri* en la región de Gómez Farías Tamaulipas (con cercanía al río) infecciones por *H. citriformis* mayores al 90% con humedad relativa entre el 70 y 80%. Estudios de biología molecular efectuados por la UAAAN, revelaron al hongo *Torrubiella*

spp. y parasitando a *H. citrifomis* (Casique-Valdés & Sánchez-Peña 2010)(Fig. 10).

En octubre del 2012 se detectó a un hongo de los Entomophthorales atacando a adultos de *D. citri* en el municipio de Papantla, Veracruz (Guizar-Guzmán & Sánchez-Peña 2013). El género *Entomophthora* ha sido reportado ocasionalmente atacando a psílidos en regiones de Europa (Jankevica 2004; Prischepa *et al.* 2011) y trópicos del sur de Asia (Villacarlos & Wilding 1994). En el Continente Americano, Alves *et al.* (2009) reportó a *Zoophthora radicans* en psílidos (*Gyropsylla spegazziniana*) en Brasil. En el mundo no se ha reportado el ataque de algún hongo de los Entomophthorales para *D. citri*.

También existen hongos que atacan a *D. citri* de manera inducida, Meyer *et al.*, (2008) informan de que existe un potencial para el desarrollo de *I. fumosorosea* como insecticida microbiano; numerosos bioensayos corroboraron la infectividad de *I. fumosorosea* aplicando a ninfas de *D. citri* a una concentración de 1×10^7 conidias/ml con mortalidades mayores a 90% después de 4 días de exposición (Avery *et al.*, 2009; Hoy *et al.*, 2010); Asimismo, evaluaciones con *M. anisopliae* en ninfas de *D. citri* muestran una mortalidad del 90% y bioensayos con cepas aisladas de suelo muestran mortalidades mayores a 90% causadas por *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Casique *et al.*, 2011).

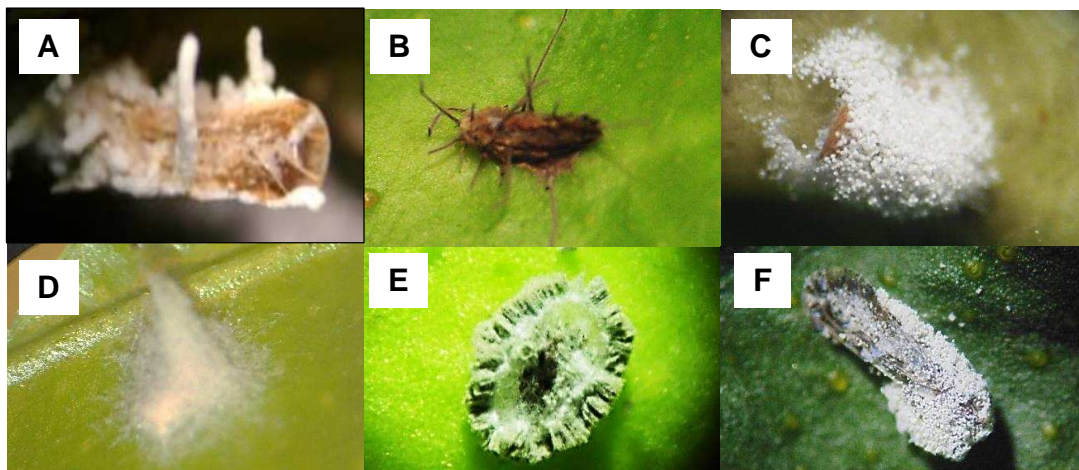


Figura 10 A) *Torrubiella* spp. Hiperparásito sobre *Hirsutella* spp., en *Diaphorina citri*, B) Sinemas del hongo *Hirsutella citrifomis* Speare C) Ninfa de *D. citri* infectada por *B. bassiana*, D) *I. fumosorosea* infectando a *D. citri*, E) Ninfa de *D. citri* infectada por *M. brunneum*, F) Adulto de *D. citri* infectado por *B. bassiana* (Fotografías por: Livier Guizar UAAAN 2013).

1.7 Proceso de infección de hongos entomopatógenos

La infección es vía conidia, la cual se adhiere a la cutícula del insecto y produce un tubo germinal que atraviesa la cutícula hasta encontrar un lugar adecuado para la penetración. El hongo detiene el crecimiento polar y las puntas de las hifas se diferencian en el apresorio, los cuales producen clavijas de infección, y éstas penetran la cutícula mediante la combinación de presión mecánica y degradación por enzimas. El hongo prolifera en el homocelo del hospedero en forma de blastospora y el insecto muere por la combinación del crecimiento fungal y toxinas, aunque algunos hongos aparentemente no poseen toxinas, sino que matan el insecto al consumir todos los nutrientes o por destrucción física (Bustillo2001). Después de muerto el insecto, si la disponibilidad de agua es alta los hongos emergen al exterior a través de la cutícula y esporulan sobre el cadáver produciendo inóculo para infectar a otros insectos. Si las condiciones no son favorables, queda dentro del cadáver del insecto, donde puede sobrevivir por algunos meses y eventualmente producirá esporas cuando existan las condiciones favorables (Tanada & Kaya1993).

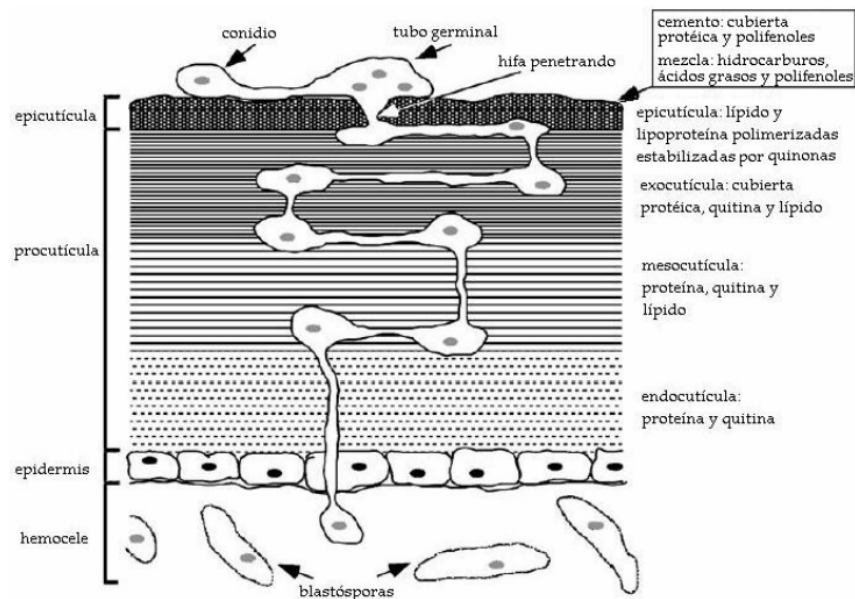


Figura 11 Estructura y composición de la cutícula del insecto y esquema de la penetración por hongos entomopatógenos (Duperchy 2003).

1.8 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 (Roberts & Humber 1981); infectan organismos en todos los órdenes de insectos, en su mayoría los ordenes Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera y Orthoptera (Ferron 1978). Los estados inmaduros (ninfas y larvas) son a menudo más infectados por los hongos que los adultos, mientras que los estados de huevo y pupa no son frecuentemente infectados (Tanada & Kaya 1993).

La mayoría de las especies son de las divisiones Ascomycota y Zygomycota (Entomophthorales) que se encuentran dentro en el orden

Hypocreales, familia *Clavicipitaceae*. Esta familia 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, sin embargo poco más de 10 han sido empleadas en el control biológico de insectos. Entre los principales se encuentran: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Aschersonia*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Isaria*, y *Lecanicillium* (López & Hans 2001; Hajek & St. Leger 1994) son los géneros de mayor importancia en el control biológico por la susceptibilidad en los insectos plaga y, a veces, 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. Por otro lado, los hongos anamorfos presentan ciclo de vida sencillo, falta de reproducción sexual y frecuentemente un 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 muchos Hyphomycetes (Ascomycota) 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).

Tradicionalmente se han utilizado diferentes caracteres morfológicos, microscópicos y macroscópicos para la clasificación de especies de hongos entomopatógenos, y debido a que la mayoría presentan ciclos de vida anamórficos, definir la diversidad genética y las especies mismas, ha sido complicado. A pesar de que los hongos entomopatógenos se encuentran distribuidos por todo el mundo, se deben tener algunas consideraciones de seguridad ambiental y de estabilidad de ecosistemas respecto a la introducción de especies exóticas (Lockwood 1993). Por lo tanto la preservación y aumento de especies endémicas es considerada una opción más apropiada para el control biológico (Carruthers & Onsager 1993; Sánchez-Peña *et al.*, 2011), y esto puede lograrse identificando las especies nativas de cada zona agrícola, con el objetivo de evitar introducir organismos exóticos en el medio ambiente. La identificación molecular por medio de análisis de PCR y RFLP se han convertido en una herramienta práctica y rápida para este tipo de estudios, los cuales han revelado que el hongo *Metarhizium anisopliae*, en realidad es un complejo de al menos nueve especies morfológicamente muy similares (Bischoff *et al.*, 2009; Wyrebeck *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2011).

Algunas de estas especies son utilizadas como agentes de control biológico, con el objetivo de reducir el impacto de los productos químicos en la salud humana y el medio ambiente. Sánchez-Peña *et al* (2011) realizó pruebas con especies de *Metarhizium*, *Beauveria* e *Isaria*, obteniendo resultados satisfactorios como biopesticidas en *D. citri*. Debido a su fácil producción masiva y actividad satisfactoria como agente de control biológico, *Metarhizium* se considera de gran importancia para la agricultura, y su correcta identificación es necesaria para continuar con este tipo de estudios. Por lo tanto el presente estudio se realizó con los siguientes objetivos:

2.1.1 Objetivo General

- Caracterizar especies de hongos entomopatógenos que atacan de manera natural e inducida a *Diaphorina citri* en México.

2.1.2 Objetivos específicos

- Identificar hongos entomopatógenos que atacan naturalmente a *D. citri* en zonas citrícolas de Veracruz, México.
- Determinar molecularmente especies de *Metarhizium* presentes en México, incluyendo cepas aplicadas experimentalmente contra *D. citri* en campo.

2.2 Hipótesis

- Se identificará al menos 1 especie de hongo entomopatógeno no reportado anteriormente, atacando de manera natural a *D. citri*
- Se determinará la presencia de al menos 2 especies moleculares de *Metarhizium* en México.

CAPÍTULO 2

INFECTION BY *ENTOMOPHTHORA* SENSU STRICTO (ENTOMOPHTHOROMYCOTA: ENTOMOPHTHORALES) IN *DIAPHORINA* *CITRI* (HEMIPTERA: LIVIIDAE) IN VERACRUZ, MEXICO

Guizar-Guzman, L., and Sanchez-Peña, S.R. 2013. Infection by *Entomophthora sensu stricto* (Entomophthoromycota: Entomophthorales) in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Veracruz, Mexico. Florida Entomologist (3): 624-627. (Published)

**INFECTION BY *ENTOMOPHTHORA* SENSU STRICTO
(ENTOMOPHTHOROMYCOTA: ENTOMOPHTHORALES) IN *DIAPHORINA
CITRI* (HEMIPTERA: LIVIIDAE) IN VERACRUZ, MEXICO**

L. GUIZAR-GUZMAN AND S. R. SANCHEZ-PEÑA*

Departamento de Parasitología , Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro,
Saltillo, Coahuila, 25315, Mexico

The Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama is one of the most important pests of citrus. It vectors the pathogenic bacterium causing the disease Huanglongbing (HLB) or Greening of citrus trees (Halbert & Manjunath 2004). Entomopathogenic fungi are important biological control agents of insects and often cause epizootics that reduce host populations dramatically (McCoy et al. 1988). Among the entomopathogenic fungi infecting *D. citri* in the field are *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Rivero-Aragon & Grillo-Ravelo 2000; Yang et al. 2006), *Hirsutella citriformis* Speare, (Rivero-Aragon & Grillo-Ravelo 2000; Subandiyah et al. 2000; Meyer et al. 2007; Casique-Valdes & Sanchez-Peña 2010; Casique-Valdes et al. 2011), *Isaria fumosorosea* Wize (Samson 1974; Subandiyah et al. 2000; Casique-Valdes & Sanchez-Peña 2010), *Isaria javanica* (Friederichs & Bally) Samson & Hywel-Jones (= *Paecilomyces javanicus* (Friederichs & Bally) Brown & Smith) (Yang et al. 2006), and *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams (= *Acrostalagmus aphidum* Oudem., *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas) (Rivero-Aragon & Grillo-Ravelo 2000; Yang et al. 2006; Casique-Valdes & Sanchez-Peña 2010). Aubert (1987) also lists *Cladosporium* nr. *oxysporum* Berk. & M.A. Curtis and the sooty mold, *Capnodium citri* Berk. and Desm. attacking *D. citri*, but the pathogenicities of these 2 usually saprophytic fungi are not clear.

We collected live *D. citri* adults in our search for fungal infections in Veracruz state, including the main producing area of Persian lime in Mexico (Sánchez-Torres et al. 2011) where tangerine and sweet orange are grown also. On 12 October 2012, live *D. citri* adults were collected on orange jessamine, *Murraya paniculata* (L.) Jack, at the localities of Ixtacuaco, La Guadalupe, San Andres, San Pedro, Totomoxtle and Venustiano Carranza, in the municipalities of Papantla, San Rafael, and Tlapacoyan in north-central Veracruz state (highway distance: aprox. 90 km). At Ixtacuaco, insects were collected from sweet orange (*Citrus × sinensis* (L.) Osbeck) also. Psyllids ($n = 210$) were placed in brown paper bags (38.5×16 cm) by shaking the insects off infested branches into the bags. The openings of each of the bags was folded and sealed with masking tape. The puffed bags containing *D. citri* adults were carefully placed in large plastic bags and moistened slightly and held at 25-30 °C during transport to the laboratory in Saltillo. In this way live healthy insects can be maintained in bags for 7 days. We expected mainly specimens of *H. citriformis*, a slow-growing fungus that is commonly found attacking *D. citri* in the Gulf Coast region of Mexico (Casique-Valdes et al. 2011).

After 3 days of keeping insects in paper bags, dead ($n = 203$) and live ($n = 7$) insects were placed in petri dishes at room temperature, under diffuse fluorescent light (10:14 h L:D) with a piece of wet cotton to maintain high humidity. Insects were observed daily to detect fungal development. One dead *D. citri* showing the typical signs of infection by an *Entomophthora* species (Entomophthorales: Entomophthoraceae) was observed in a paper bag on day 3 after collection; on day 6, there were 2 additional similar dead insects (all from Venustiano Carranza, Papantla) in petri dishes (total 1.4% infection) (Fig. 1A-C). These insects had swollen abdomens, that angled away from the substrate; wings spread latero-dorsally and raised above the abdomen, and

conspicuous masses of glutinous hyphae and conidiophores on the abdomen and thorax, similar to the well-known fungus *Entomophthora muscae* (Cohn) Fres., infecting flies (Diptera: Muscidae) (Mullens 1990; Krasnoff et al. 1995). All infected insects were collected at Venustiano Carranza, Papantla: N 20° 27'18" W 97° 17' 06". Fungi in the Entomophthorales forcibly eject their primary conidia (PC) (Keller 2007). Thus, slides were placed in the petri dish under infected insects attempting to collect discharged conidia.

Two of these insects became rapidly overgrown by saprophytic fungi (mainly *Cladosporium* sp.; Capnodiales: Davidiellaceae), which completely obscured the original pathogen. In petri dishes, some dead adults in typical *Entomophthora*-infected posture were also overgrown by fungal saprophytes. This rapid secondary fungal growth is frequently observed on other insects killed by Entomophthorales (Sanchez-Peña 1993).

Thus the percent infection by *Entomophthora* is possibly underestimated. Unfortunately no PC landed on the slides placed under infected insects for microscopic examination; they landed on the bottom of the petri dish. Pictures of unstained conidia shown were taken from the dish bottom under the compound microscope. Most PC observed had germinated, producing long germ tubes and/or secondary conidia (SC) (Humber 1981; Keller et al. 2007). The pictures herein are either of PC emptied of cytoplasmic contents, or perhaps slightly dehydrated, and measured with the software Axioma Vision 4.5. Both PC and SC observed are typical of the genus *Entomophthora* Cohn in the strict sense (Humber 1981). PC are campanulate, with a flat base, surrounded with a halo of mucilage upon discharge (Fig. 1A-C), with prominent apical point and broad basal papilla, $16.6 \times 22.7 \mu\text{m}$; SC were globose, with broad basal papilla, $14.1 \times 11.6 \mu\text{m}$, borne apically on a short conidiophore arising from PC

(Fig.2). This is similar to the spore size (PC: 11.5-20.5 × 9-18.5 μm; SC: 11.5-16 × 9-11.5 μm) of *Entomophthora philippinensis* infecting the leucaena psyllid, *Heteropsylla cubana* Crawford, in the Philippines (Villacarlos & Wilding 1994).

We also observed the mucous cytoplasm halo around the discharged PC, typical of *Entomophthora* (Fig. 1D-F) (Eilenberg et al. 1986). Most PC were empty (had germinated) when detected, and no nuclei were observed; they also lysed a few hours later. Thus it is not possible to assign this fungus to a species with certainty since number and size of conidial nuclei are essential criteria for the identification of *Entomophthora* species (Humber 1981; Keller 2007). Entomophthorales have been occasionally reported to attack psyllids in temperate regions of Europe (Prischepa et al. 2011; Jankevica 2004) and the tropics of South Asia (see review in Villacarlos & Wilding 1994). In the New World tropics, Alves et al. (2009) reported *Zoophthora radicans* on psyllids (*Gyropsylla spegazziniana*) in Brazil; however, the globose spores and coarse hyphae shown do not correspond to the capillary conidia characteristic of *Zoophthora* and perhaps describe a mixed infection with *Batkoa* or other fungus. Felix-Alvarez et al. (2003) mentioned infections by Entomophthorales on *D. citri* in Matanzas, Cuba, but provide no further description of the fungi involved.

Most *Entomophthora* species are restricted to a narrow range of closely related host species (Geden et al. 1993). It is possible that in the New World this fungus host-jumped to the exotic *D. citri* from another (psyllid?) host. This was possibly the case for *E. philippinensis* on *H. cubana*, which is exotic in the Philippines (Villacarlos & Wilding 1994). There are no records of Entomophthorales infections on *D. citri* from Mexico, possibly because *Entomophthora* had recently host-switched to this invasive host and/or because the fungus has not become widespread or abundant. Even though we did not observe epizootics of this fungus in this region of Veracruz, epizootics by a

similar fungus have apparently occurred in the Ixtacuaco area in previous seasons (C. Hernandez-Torres, INIFAP, pers. comm.). This fungal species is of interest as a new potential biological control agent of *D. citri*. *Entomophthora* species can cause high mortality levels among hosts (Geden et al. 1993). Considering the inherently high infective potential of the Entomophthorales, this fungus could be considered for introduction into other citrus-growing areas to enhance the natural enemy complex for *D. citri*, after host range studies.

The observations of Dr. R. A. Humber (USDA-ARS) are gratefully acknowledged. O. E. Rosales-Escobar assisted on logistics. Supported by J. I. López-Arroyo and Project CONACYT-INIFAP (FONSEC 108591), Mexico.

SUMMARY

In a survey of natural enemies of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, live adults of this insect were collected at and near the municipalities of Papantla and Tlapacoyan, in central Veracruz state, Mexico, and held in the laboratory looking for individuals infected with entomopathogenic fungi. A species of the fungus *Entomophthora* Cohn *sensu stricto* (Entomophthoromycota: Entomophthorales) was observed infecting 1.4% adult insects (n=210) collected from orange Jessamine, *Murraya paniculata*, at the town of Venustiano Carranza, municipality of Papantla. *Diaphorina citri* is a new host record for this entomopathogenic fungal genus.

Keywords: *Entomophthora*, fungus, new host

RESUMEN

En la búsqueda de enemigos naturales del psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri*, se colectaron adultos vivos de este insecto dentro y cerca de los municipios de Papantla y Tlapacoyan, en el estado de Veracruz, México, y se mantuvieron en el laboratorio para detectar individuos infectados con hongos entomopatógenos. Se observó una especie del hongo *Entomophthora Cohn sensu stricto* (Entomophthoromycota: Entomophthorales) infectando 1.4% de insectos adultos (n=210) colectados de limonaria, *Murraya paniculata*, en el pueblo de Venustiano Carranza, municipio de Papantla. *Diaphorina citri* es un nuevo registro de hospedero para este género de hongo entomopatógeno.

Palabras clave: *Entomophthora*, hongo, nuevo hospedero

REFERENCES CITED

- ALVES, L. A., LEITE, L. G., AND DE OLIVEIRA, D. G. P. 2009. Primeiro registro de *Zoophthora radicans* (Entomophthorales:Entomophthoraceae) em adultos da ampola-da-erva-mate, *Gyropsylla spegazziniana* Lizer & Trelles (Hemiptera: Psyllidae). Neotrop.Entomol. 38(5): 697-698.
- AUBERT, B. 1987.*Trioza erytreae*del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama

(Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. *Fruits* 42: 149-162.

CASIQUE-VALDES, R., AND SANCHEZ-PEÑA, S. R. 2010. Entomopathogenic fungi attacking the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in the Gulf citrus zone of Mexico, pp. 2-3 *In Proc. 58th Mt., Southwestern Branch, Entomol. Soc. America, Cancun, Mexico.*

CASIQUE-VALDES, R., REYES-MARTINEZ, A. Y., SANCHEZ-PEÑA, S. R., BIDOCHKA, M. J., AND LOPEZ-ARROYO, J. I. 2011. Pathogenicity of *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Cordycipitaceae) to *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) and *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Triozidae). *Florida Entomol.* 94 (3): 703-705.

EILENBERG, J., BRESCIANI, J., AND LATGE, J. P. 1986. Ultrastructural studies of primary spore formation and discharge in the genus *Entomophthora*. *J. Invertebr. Pathol.* 48(6): 318-324.

FELIX-ALVAREZ, J., NARANJO-MONTES DE OCA, F., AND GRILLO-RAVELO, H. 2003. Hongos entomopatógenos de *Diaphorina citri* Kirk. (Homoptera; Psyllidae) en Jovellanos, Matanzas. *Centro Agrícola* 30(2): 87.

GEDEN C., STEINKRAUS D. C., AND RUTZ, D. A. 1993. Evaluation of two methods for release of *Entomophthora muscae* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) to infect house flies (Diptera: Muscidae) on dairy farms. *Environ. Entomol.* 20(8): 1201-1208.

- 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 Entomol.* 87(22): 330-352.
- HUMBER, R.A. 1981. An alternative view of certain taxonomic criteria used in the Entomophthorales. *Mycotaxon* 13(49): 191-240.
- JANKEVICA, L. 2004. Ecological associations between entomopathogenic fungi and pest insects recorded in Latvia. *Latvia Entomol.* 41(6): 60-65.
- KELLER, S. 2007. Systematics, taxonomy and identification, pp. 111-113 *In* S. Keller [ed.], *Arthropod-pathogenic Entomophthorales: Biology, Ecology, Identification*. Office for Official Publications of the EC.Luxembourg.
- KRASNOFF, S. B., WATSON, D. W., GIBSON, D. M., AND KWAN, E. C. 1995. Behavioral effects of the entomopathogenic fungus, *Entomophthora muscae*, on its host *Musca domestica*: postural changes in dying hosts and gated pattern of mortality. *J. Insect. Physiol.* 41(8): 895-903.
- McCOY, C. W., SAMSON, R. A., AND BOUCIAS, D. G. 1988. Entomogenous fungi, pp. 151-236 *In* C. M. Ignoffo [ed.], *Handbook of Natural Pesticides, Vol. 5, Microbial Insecticides, Part A, Entomopathogenous Protozoa and Fungi*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- MEYER, J. M., HOY, M. A., AND BOUCIAS, D. G. 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.

- MULLENS, B. A. 1990. *Entomophthora muscae* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) as a pathogen of filth flies, pp. 231-245 In D. A. Rutz and R. S. Patterson [eds.], Biocontrol of Arthropods Affecting Livestock and Poultry. Westview Press, Boulder, CO.
- PRISCHEPA, L., MIKULSKAYA, L., AND GERASIMOVICH, M. 2011. Diversity of entomopathogenic microorganisms in pest populations of Bialowieza forest stands. Vytauto Didžiojo universiteto Botanikos sodo raštai 15(9): 72-81.
- RIVERO-ARAGON, A., AND GRILLO-RAVELO, H. 2000. Natural enemies of *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) in the central region of Cuba. Centro Agricola 27 (3): 87-88.
- SAMSON, R.A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. Stud. Mycol. 6(119): 1-119.
- SANCHEZ-PENA, S. R. 1993. Entomogenous fungi associated with the cotton aphid in the Texas High Plains. Southwestern Entomol. 18(3): 69-71.
- SANCHEZ-TORRES, Y., MATUS-GARDEA, J. A., AND GARCIA-SALAZAR, J. A. 2011. Estimación de la demanda de importaciones de limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) en estados unidos procedentes de México (1994-2008). Trop. Subtrop. Agroecosyt. 14(8): 819-827.
- SUBANDIYAH, S., NIKOH, N., SATO, H., WAGIMAN, F., TSUYUMU, S., AND FUKATSU, T. 2000. Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera; Psylloidea) in Indonesia. Mycoscience 41(5): 509-513.

VILLACARLOS, L., AND WILDING, N. 1994. Four new species of Entomophthorales infecting the leucaena psyllid *Heteropsylla cubana* in the Philippines. Mycol. Res. 98 (2): 53-164.

YANG, Y., HUANG, M., BEATTIE, G. A. C., XIA, Y., OUYANG, G., AND XIONG, J. 2006. Distribution, biology, ecology and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, a major pest of citrus: a status report for China. Intl. J. Pest Mgt. 52: 343-352.

FIGURE CAPTION

Fig. 1. *Entomophthora* sp. on *Diaphorina citri*. Figs. 1A-1C. Dead *D. citri* adults with typical position of *Entomophthora*-infected insects (see text); the same insect is in A and B. Figs. 1D-1F. Conidia of *Entomophthora* sp. Fig. 1D. Empty or dehydrated primary conidium (22.7 x 16.6 μm) with typical shape of *Entomophthora* species. Fig. 1E. Empty primary conidium (*) and production of secondary conidium (14.1 x 11.6 μm) with small germ tube. Fig. 1F. Empty campanulate primary conidium (*) and production of secondary conidium. The halos in D-E (arrows) formed upon conidial attachment to hard surfaces. Bar = 1mm (Figs. 1A-1C); Bar = 11 μm (Fig. 1D), Bar = 7 μm (Figs. 1E and 1F).

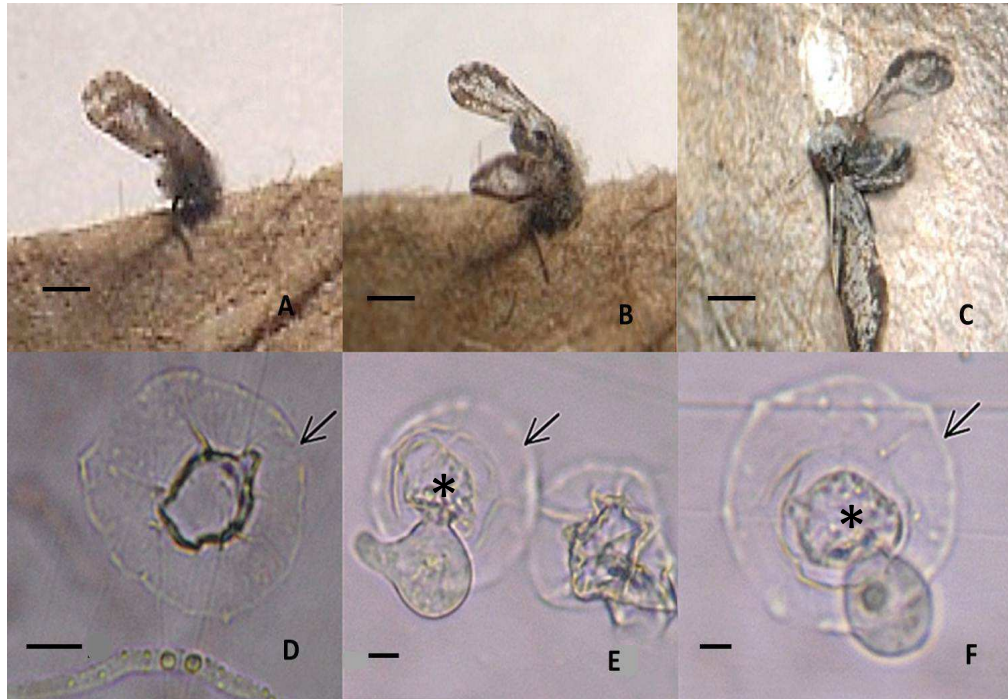


FIGURE CAPTION

Fig. 1. *Entomophthora* sp. on *Diaphorina citri*. Figs. 1A-1C. Dead *D. citri* adults with typical position of *Entomophthora*-infected insects (see text); the same insect is in A and B. Figs. 1D-1F. Conidia of *Entomophthora* sp. Fig. 1D. Empty or dehydrated primary conidium (22.7 x 16.6 μm) with typical shape of *Entomophthora* species. Fig. 1E. Empty primary conidium (*) and production of secondary conidium (14.1 x 11.6 μm) with small germ tube. Fig. 1F. Empty campanulate primary conidium (*) and production of secondary conidium. The halos in D-E (arrows) formed upon conidial attachment to hard surfaces. Bar = 1mm (Figs. 1A-1C); Bar = 11 μm (Fig. 1D), Bar = 7 μm (Figs. 1E and 1F).

CAPÍTULO 3

Distribution of *Metarhizium* species complex in North America: comparisons of Chihuahuan desert, Subtropical, and Mesoamerican isolates

Guizar-Guzman, L., Padilla-Guerrero I.E., Humber, R., Bidochka, M.J., Lopez-Arroyo J.I., and Sanchez-Peña, S.R. 2013. Distribution *Metarhizium* species complex in Mexico: comparisons from desert to tropical rain forest isolates (in review).

Distribution of *Metarhizium* species complex in North America: comparisons of Chihuahuan desert, Subtropical, and Mesoamerican isolates

Guizar-Guzman L.¹, Padilla-Guerrero I. E.², Bidochka M. J.², Humber R.A.³, Lopez-Arroyo J.I.⁴, Sanchez Peña S.R.¹

¹Department of Parasitology, University Autonoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, 25315, Mexico

²Department of Biological Sciences, Brock University, 500 Glenridge Avenue, St Catharines, ON L2S 3A1, Canada

³USDA-ARS Biological Integrated Pest Management Research, Robert W. Holley Center for Agriculture and Health, Ithaca, NY 14853-2901, USA.

⁴Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental General Teran. Km. 31 Montemorelos-China. 67400 General Teran, N.L., Mexico.

Introduction

Species of the fungal genus *Metarhizium* (Clavicipitaceae) belong to the Hypocreales of the Ascomycota and it is a facultative insect pathogen of over 200 species of insects (Hajek & St. Leger 1994). Individual isolates can show a bifunctional lifestyle, as entomopathogens including pests of economic importance, and as plant rhizosphere colonizers (Hu & St. Leger, 2002). *Metarhizium* species are found throughout temperate, tropical, hot semiarid and arctic areas (St Leger *et al.*, 1992). Variable characters have been used for *Metarhizium* species separation, also most of the entomopathogenic hypocrealean fungi have probably exclusively anamorphic life cycles, which complicates defining biological species and comparing genetic diversity. Recent studies (Bischoff *et al.*, 2009) have revealed that the most common and economically important species of *Metarhizium*, *M. anisopliae*, is actually a species complex of morphologically similar species. Schneider *et al.* (2011) describes a group (clade 1) that includes eight distinct molecularly identifiable, *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M. brunneum*, *M. globosum*, *M. guizhouense*, *M. pingsahense*, *M. acridum* and *M. majus*. Some of these species are being used as biological control agents to manage and prevent infestations, with the aim of reducing the use and impact of chemicals on human health and the environment. *Metarhizium* species are more frequently found in sun-exposed and disturbed habitats (*i.e.*, cultivated areas) than in shaded or forested

habitats (Steenberg 1995) and also show rhizosphere associations with specific plants within a habitat (Bidochka *et al.*, 2001).

Entomopathogenic fungi are distributed all over the world, and some morphospecies are considered cosmopolitan; however, there might be different patterns of abundance in different habitats and localities (Bidochka *et al.*, 1998). There are also significant considerations on environmental safety and ecosystem stability regarding the introduction of exotic strains of fungi (Lockwood, 1993); therefore, the preservation or augmentation of endemic or local strains are considered more appropriate options for biological control (Carruthers & Onsager 1993; Sanchez-Peña *et al.*, 2011)

The objective of this research was to identify the *Metarhizium* species associated to (mostly) agricultural crops soils in different climatic regions of Mexico, detecting specific RFLP patterns associated with specific sequences (Wyrebeck *et al.*, 2011) .

Materials and methods

Collection of soil samples

Soil samples were taken from agricultural soils of different climate zones, Chihuahuan desert and valleys (Saltillo, Coahuila); semiarid, subtropical scrub (General Teran and Yerbaniz, Nuevo Leon; Gomez Farias, Alta Cima, Novillo and Victoria, Tamaulipas); cloud forest (Armadillo de los Infante, San Luis Potosi); tropical rain forest and coastal savanna (Ixtacuaco and Flores Magon, Veracruz; Tecoman, Colima); tropical savanna (Parral, Chiapas; Cardenas, Tabasco). Samples of 500gr to 1kg were usually taken with a shovel that was disinfected between samples by rinsing with ethanol (Figure 1).

***Metarhizium* Isolation**

The fungi were isolated from soil with the “*Galleria* bait method” (Zimmerman, 1986),

modified for *T. mollitor* (Sanchez-Peña *et al.*, 2010). Control *T. mollitor* larvae were placed under high humidity in petri dishes prior and during the baiting experiments to ensure that they were disease free. Each soil sample was placed into a 250ml (9x7cm) plastic container; the soil samples were moistened when needed in order to maintain high humidity. Three larvae were placed on the soil, and containers were incubated at 25 °C \pm 1 for 21 days. Larvae were checked after 7, 14 and 21 days. Dead larvae were removed and placed in humid chamber, and were checked for fungal growth every 5 days. When the presence of a fungus was observed, conidia were removed with a sterile toothpick and placed onto potato dextrose agar or, if contamination was important, selective media for anamorph entomopathogenic fungi (1L potato dextrose agar, 1g yeast extract, 0.25 g/L cycloheximide, 0.5 g/L chloramphenicol, 0.004g thiabendazole, 0.02g/L 65% dodine and 0.01 g/L crystal violet) (Veen & Ferron 1966, modified by S. Jones and M. Bidochka personal communication).

Fungi were identified by microscopical examination of sporulating structures. Cultures recovered from individual infected larvae were considered to be one isolate.

DNA extraction

Eighteen of the isolates (100) were inoculated into liquid media (200g potato, 2% yeast extract, 1% dextrose) for five days. Mycelia were harvested with sterile tweezers, washed with ethanol 70% twice and suspended in ethanol 96%. These mycelia were dried onto filter paper for 20 min or until all ethanol was removed by evaporation and then crushed in liquid nitrogen with mortar and pestle. DNA was extracted with Quiagen DNeasy plant mini kit (Quiagen Inc., Mississauga, Ontario). For the rest of the samples (82) DNA was extracted harvesting with a toothpick live spores from petri dishes and placed into 1.5ml tubes, samples were then microwaved for 5 minutes and left inside the microwave for 5 min to cool down and avoid tubes popping because of temperature changes; then 50 μ l of buffer (20mM Tris HCL pH 8.0 + 10mM EGTA) was added and finally samples were vortexed for 1 minute (Ferreira *et al.*, 1996, modified by S. Jones and M. Bidochka personal communication).

PCR amplification and RFLP analysis

For polymerase chain reaction (PCR) forward primer EF-1 α (5'-ATGGGTAAGGAGACAAGAC) and reverse primer EF-2 α (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT) of ribosomal large-subunit D1-D2 were used. Amplifications were performed in a DNA Thermal cycler (Eppendorf Mastercycler) at: 95°C for 1min, 35 cycles of 95°C 20sec, 55°C 1min, 72°C 1.5min and a final extension of 72°C for 3min. PCR products were stored at 4°C until used. The amplification product was double digested with MseI and XhoI, in a total volume per sample of 20 μ l, which included 5 μ l EF-1 α PCR product, 2 μ l NE Buffer 4 (New England Biolabs, Ipswich, Suffolk, NEB), 2 μ l BSA 10X, 1 μ l MseI (NEB), 1 μ l XhoI (NEB) and 9 μ l H₂O HPLC (High-performance liquid chromatography). Reactions were incubated at 37°C for 16h (Wyrebek *et al.*, 2011). The amplified PCR and RFLP products were visualized by electrophoresis on a 1% and 2% agarose gel respectively and ran at 80V for 45min in 0.5x TBE buffer.

Random PCR products in this study were cloned into the pGEM-T easy vector (Promega Iberica S.L., Barcelona) and sent to the core molecular biology lab at York University, ON for sequencing.

Results and Discussion

The molecular analysis revealed that at least two species of *Metarhizium* occur in Mexico, the double digested RFLP banding patterns analysis showed *M. robertsii* and *M. brunneum* "alternate"(Fig. 2). This "alternate" *M. brunneum* shared 99.2% identity with the other previously known *M. brunneum* EF-1 α gene sequence (Wyrebek *et al.*, 2011).

Our data indicate that *M. brunneum* "alternate" is more abundant in Mexican soils, and "typical" *M. brunneum* has not been detected so far; while *M. robertsii* is the most prevalent in Canadian soils. *M. robertsii* and *M. brunneum* alternate are distributed in

the agricultural soils of Mexico in these percentages: Saltillo and San Luis Potosí 100% of *M. robertsii*; Tamaulipas, Chiapas, Tabasco and Colima 100% of *M. brunneum* “alternate”; Nuevo Leon 90.0% and Veracruz 71.42% of *M. brunneum* “alternate” and the rest of the samples from these states were *M. robertsii* (Table 1), while Wyrebeck *et al.* (2011) reported that in Ontario 75.24% of the fungi obtained are *M. robertsii*; 10.89% are *M. brunneum*; 3.96% are *M. brunneum* “alternate”; and 9.9% are *M. guizohuense*. Our preliminary observations indicate that it is possible that the "typical" *M. brunneum* and the "alternate" *M. brunneum* are different species since their sequences are 99.2% similar; however analysis of additional markers (genes) are required in order to support the possible identification of the species.

In Mexico no “typical” *M. brunneum* or *M. guizohuense* were found in the analysed isolates. In most of the sites of collection only *M. brunneum* “alternate” was found. This makes us consider that the methodology could be biased, with some fungi being selected more easily with the methods and isolation techniques used in the present study, or that some fungi could be locally more abundant than others, and therefore they are isolated more frequently; more studies are required to test these hypotheses.

Table 1. *Metarhizium* spp. isolates used in this study and their molecular species, locality, source and vegetation/insect.

No	Isolate	Species	City and state	Source	Vegetation or insect host
1	MT1	<i>M. brunneum</i> <i>alternate</i>	Yerbaniz, NL	Rizosphere	Orange, <i>Citrus</i>
2	MT2	<i>M. robertsii</i>	Ixtacuaco, VER	Rizosphere	Tropical cedar, <i>Cedrela</i>
3	MT3	<i>M. robertsii</i>	Ixtacuaco, VER	Rizosphere	Tropical cedar, <i>Cedrela</i>
4	MT4	<i>M. brunneum</i> <i>alternate</i>	Flores Magon, VER	Rizosphere	Banano, <i>Musa</i>
5	MT5	<i>M. brunneum</i> <i>alternate</i>	Flores Magon, VER	Rizosphere	Banano, <i>Musa</i>
6	MT6	<i>M. brunneum</i> <i>alternate</i>	Flores Magon, VER	Rizosphere	Banano, <i>Musa</i>

7	MT7	<i>M. brunneum alternate</i>	Flores Magon, VER	Rizosphere	Banano, <i>Musa</i>
8	MT8	<i>M. brunneum alternate</i>	General Teran, NL	Rizosphere	Orange, <i>Citrus</i>
9	MT9	<i>M. brunneum alternate</i>	General Teran, NL	Rizosphere	Orange, <i>Citrus</i>
10	MT10	<i>M. brunneum alternate</i>	General Teran, NL	Rizosphere	Orange, <i>Citrus</i>
11	MT11	<i>M. robertsii</i>	General Teran, NL	Rizosphere	Orange, <i>Citrus</i>
12	MT12	<i>M. brunneum alternate</i>	General Teran, NL	Rizosphere	Orange, <i>Citrus</i>
13	MT14	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Agricultural field
14	MT15	<i>M. robertsii</i>	General Teran, NL	Rizosphere	Orange, <i>Citrus</i>
15	MT17	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Agricultural field
16	MT21	<i>M. brunneum alternate</i>	Alta Cima, TAM	Rizosphere	Cycad, <i>Dioon</i>
17	MT22	<i>M. brunneum alternate</i>	Novillo, TAM	Rizosphere	Oak, <i>Quercus</i>
18	MT23	<i>M. brunneum alternate</i>	Novillo, TAM	Rizosphere	Oak, <i>Quercus</i>
19	MT24	<i>M. brunneum alternate</i>	Alta Cima, TAM	Rizosphere	Cycad, <i>Dioon</i>
20	MT25	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	<i>Sorghum</i>
21	MT26	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	<i>Sorghum</i>
22	MT27	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Brocoli, <i>Brasicae</i>
23	MT28	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Nopal, <i>Opuntia</i>
24	MT29	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Nopal, <i>Opuntia</i>
25	MT30	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Lawn, <i>Stenotaphrum</i>
26	MT31	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	<i>Sorghum</i>
27	MT32	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Tomato, <i>Lycopersicum</i>
28	MT33	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Alfalfa, <i>Medicago</i>
29	MT34	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Onion, <i>Allium</i>
30	MT35	<i>M. robertsii</i>	Saltillo,	Rizosphere	Tomato,

			COAH		<i>Lycopersicum</i>
31	MT36	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Lawn, <i>Stenotaphrum</i>
32	MT38	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Nopal, <i>Opuntia</i>
33	MT39	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Lawn, <i>Stenotaphrum</i>
34	MT40	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Lawn, <i>Stenotaphrum</i>
35	MT41	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Sorghum
36	MT42	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Tomato, <i>Lycopersicum</i>
37	MT43	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Lawn, <i>Stenotaphrum</i>
38	MT44	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Agricultural field
39	MT45	<i>M. robertsii</i>	Saltillo, COAH	Rizosphere	Agricultural field
40	MT47	<i>M. brunneum alternate</i>	Gomez Farias, TAM	Rizosphere	Orange, <i>Citrus</i>
41	MT49	<i>M. brunneum alternate</i>	General Teran, NL	Rizosphere	Orange, <i>Citrus</i>
42	MT50	<i>M. brunneum alternate</i>	General Teran, NL	Rizosphere	Orange, <i>Citrus</i>
43	MT51	<i>M. brunneum alternate</i>	General Teran, NL	Rizosphere	Orange, <i>Citrus</i>
44	MT52	<i>M. brunneum alternate</i>	General Teran, NL	Rizosphere	Orange, <i>Citrus</i>
45	MT55	<i>M. brunneum alternate</i>	General Teran, NL	Rizosphere	Orange, <i>Citrus</i>
46	MT56	<i>M. brunneum alternate</i>	General Teran, NL	Rizosphere	Orange, <i>Citrus</i>
47	MT59	<i>M. robertsii</i>	General Teran, NL	Rizosphere	Orange, <i>Citrus</i>
48	MT60	<i>M. robertsii</i>	Armadillo de los Infante, SLP	Rizosphere	Pine, <i>Pinus</i>
49	MT61	<i>M. robertsii</i>	Armadillo de los Infante, SLP	Rizosphere	Pine, <i>Pinus</i>
50	MT62	<i>M. robertsii</i>	Armadillo de los Infante, SLP	Rizosphere	Pine, <i>Pinus</i>
51	MT64	<i>M. robertsii</i>	Armadillo de los Infante, SLP	Rizosphere	Pine, <i>Pinus</i>

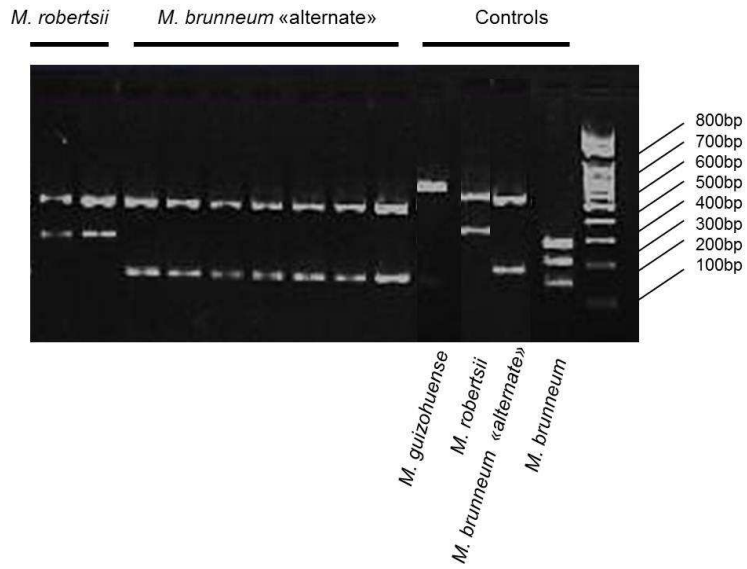
52	MT65	<i>M. robertsii</i>	Mexico	Insect	<i>Anagyrus</i> sp.
53	MT66	<i>M. brunneum alternate</i>	Colima COL	Insect	<i>Geraeus senilis</i>
54	MT68	<i>M. brunneum alternate</i>	Cerro de Ortega, COL	Insect	<i>Schistocerca piceifrons</i>
55	MT69	<i>M. brunneum alternate</i>	Parral, CH	Insect	locust, <i>Schistocerca piceifrons</i>
56	MT70	<i>M. brunneum alternate</i>	Cardenas, TAB	Rizosphere	<i>Sugar cane</i>
57	MT71	<i>M. brunneum alternate</i>	Mexico	Insect	Hemiptera
58	MT72	<i>M. brunneum alternate</i>	Tecoman, COL	Insect	<i>Pogonomyrmex</i> sp.
59	MT73	<i>M. brunneum alternate</i>	Colima, COL	Insect	<i>Spodoptera frugiperda</i>
60	MT74	<i>M. brunneum alternate</i>	Colima, COL	Insect	<i>Boophilus</i> sp.

NL = Nuevo León, VER = Veracruz, COL = Colima, CH = Chiapas, TAB = Tabasco, SLP = San Luis Potosi, COAH = Coahuila.

Fig 1. A map of the study area. Green arrows show the zones where samples of *Metarhizium* spp. were taken.



Fig 2. RFLP analysis of 5'EF-1 α using MseI and XhoI for *Metarhizium* isolates.



REFERENCES

- BICHOFF, J. F., REHNER, S. A., AND HUMBER, R.A. 2009.A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage.Mycologia (101): 512–530.
- BIDOCHKA, M.J., KASPERSKI, J. E., AND WILD G. A. M. 1998.Ocurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. Can. J. Bot. (76): 1198-1204.
- BIDOCHKA, M. J., KAMP, A. M., LAVENDER, T. M., DEKONING, J. AND DE CROSS, J. N. A. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? Appl. Environ. Microbiol. (67): 1335- 1342.
- CARRUTHERS, R.I. AND ONSAGER, J.A. 1993. Perspective on the use of exotic natural enemies for biological control of pest grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). Environ. Entomol.(22): 885-903
- FERREIRA-ALDANE, V.B., AND GLASS, N. L. 1996. PCR from fungal spores after microwave treatment. Fungal Genet.Newsl. (43): 25-26.
- GUO, H.L., YE.B.L., YUE, Y.Y., CHEN, Q.T., AND FU, C.S. 1986.Three new species of *Metarhizium*.Acta. Mycol.Sinica(5):185–190.
- HAJECK, A. E., AND ST. LEGER, R. J. 1994.Interaction between fungal pathogens and insect hosts.Annu. Rev. Entomol. (39): 293-322.
- HU, G., AND ST. LEGER, R. J. 2002.Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. Appl. Environ.Microbiol. (68): 6383-6387.

- LIANG, Z.Q., LIU, A.Y., AND LIU, J.L. (1991) A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* anamorph. *Acta.Mycol.Sinica.* (10):257–262.
- LIU, A.Y., LIANG, A.E., AND CAO, L. (1989) Isolation and identification for *Metarhizium biformisporae*. *J.of GuizhouAgr. Coll.* (2):27–31.
- LOCKWOOD, J.A. 1993. Environmental issues involved in biological control of rangeland grasshopper with exotic agents. *Environ. Entomol.*(22): 503-5518.
- RATH, A. C., KOEN, T. B., AND YIPT, H.Y. 1992. The influence of abiotic factors on the distribution and abundance of *Metarhizium anisopliae* in Tasmanian pasture soils. *Mycol.* 96 (5):378-384 .
- ROMBACH, M.C., HUMBER, R.A., AND ROBERTS, D.W. 1986. *Metarhizium flavoviride* var. *minus* var. nov., a pathogen of plant and leafhoppers on rice in the Phillipines and Solomon Islands. *Mycotaxon* (27):87–92.
- SÁNCHEZ-PEÑA, S.R., LARA, J.S, AND MEDINA R.F. 2010 Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, Mexico, and their virulence towards thrips and whiteflies. *J. Insect Sci* (10): 1-10.
- SCHNEIDER, S., REHNER, S.A., WIDMER, F., AND ENKERLI, J. 2011. A PCR-based tool for cultivation-independent detection and quantification of *Metarhizium* clade 1. *J. Invertebr Pathol.* (2):106-14.
- STEENBERG, T. 1995. Natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. With focus on infectivity to *Sitona* species and other insects in lucerne. Ph.D. Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark.

- ST. LEGER, R. J., MAY, B., ALLEE, L. L., FRANK, D. C., STAPLE, R. C., AND ROBERTS, D. W. 1992. Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* (60):89–101.
- VEEN, K. H., AND FERRON, P. 1966. A selective medium for isolation of *Beauveria tenella* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* (8): 268-269.
- WYREBEK, M., C. HUBER, R. K. SASAN, AND M. J. BIDOCHKA. 2011. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. *Microbiology* (157): 2904 – 2911.
- ZIMMERMAN, G. 1986. The “*Galleria* bait method” for detection of entomopathogenic fungi in soil. *J. Appl. Entomol.* (102): 213-215.

IV. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

1. Se observó una especie del hongo *Entomophthora* Cohn *sensu stricto* (Entomophthoromycota: Entomophthorales) infectando 1.4% de insectos adultos (n=210) colectados de limonaria, *Murraya paniculata*, en el pueblo de Venustiano Carranza, municipio de Papantla. *Diaphorina citri* es un nuevo registro de hospedero para este género de hongo entomopatógeno en el mundo.

Los Entomophthorales ya han sido reportados atacando a insectos de la superfamilia Psylloidea en zonas templadas de Europa (Jankevica 2004; Prischepa *et al.* 2011) y en el trópico en el Sur de Asia (Villacarlos & Wilding 1994). Alves *et al.* (2009) reportan a *Zoophthora radicans* en psílidos (*Gyropsylla spegazziniana*) en Brasil, sin embargo, las esporas globosas e hifas gruesa mostrados no se corresponden con la forma de las conidias característica de *Zoophthora* y tal vez describen una infección mixta con *Batkoa* u otro hongo. Felix-Alvarez *et al.* (2003) mencionó las infecciones por Entomophthorales de *D. citri* en Matanzas, Cuba, pero no ofrecen una descripción más detallada de los hongos involucrados. Por lo que para el continente americano en realidad este es el primer reporte de Entomophthorales en psílidos.

Aunque no observamos epizootias de este hongo en esta región de Veracruz, debido a su alto potencial, la introducción de los Entomophthorales a otras áreas citrícolas pudiera contemplarse, Geden *et al.*, (1993) reporta que es posible mantener el hongo, pasándolo de insecto a insecto, ya que es bastante complicado reproducirlo en medio artificial. Esto con el objetivo de incrementar el complejo de enemigos naturales contra *D. citri*, después de hacer estudios sobre su rango de hospederos.

Las especies de *Entomophthora* son capaces de ocasionar altos niveles de mortalidad en sus hospederos, sin embargo la mayoría de las especies de este hongo están restringidas a un rango limitado de hospederos generalmente relacionados entre sí (Geden *et al.* 1993). Esta es una característica deseable desde el punto de vista ecológico. Por lo tanto la especificidad de Entomophthorales es una herramienta muy valiosa para reducir insectos plaga como *D. citri*, ya que insectos no plaga no serán atacados (Keller 2007).

Muchas especies de Entomophthorales son conocidas por tener un solo hospedero, esto puede demostrar un limitado conocimiento del rango de hospederos o un alto nivel de especialización. Insectos gregarios como áfidos y ácaros tienden a permanecer en la colonia cuando están infectados, ahí el hongo tiene una mayor oportunidad de infectar a nuevos hospederos (Keller 2007).

Es posible que en el nuevo mundo este hongo haya pasado de algún hospedero, (posiblemente de la familia Liviidae u otra familia de Psylloidea) hacia *D. citri*. No existen registros de infecciones por Entomophthorales en *D. citri* en el mundo, posiblemente porque *Entomophthora* ha cambiado recientemente de hospedero y/o porque el hongo no se ha distribuido o no es abundante.

2. En las muestras de suelo de México se encontraron las especies caracterizadas molecularmente *M. robertsii* y *M. brunneum* "alterno", con una distribución en estos porcentajes: Saltillo y San Luis Potosí 100% de *M. robertsii*, Tamaulipas, Chiapas, Tabasco y Colima 100% de *M. brunneum* "alterno", Nuevo León 90.0% y 71.42% de Veracruz *M. brunneum* "alterno".

Wyrebeck *et al.* (2011) reportaron que 75.24% de las muestras en Ontario son *M. robertsii*; 10.89% son *M. brunneum*; 3.96% son *M. brunneum* "alterno" y 9.9% son *M. guizohuense*. Nuestros datos indican que *M. brunneum* "alterno" es más abundante en suelos Mexicanos y que el "típico" *M. brunneum* no se ha detectado hasta el momento; mientras que en suelos Canadienses *M. robertsii* es el más abundante.

En el presente trabajo, en México solo se detectó la presencia de *M. robertsii* y *M. brunneum* "alterno". Este *M. brunneum* "alterno" comparte 99.2% de identidad con *M. brunneum*, en la secuencia del gen EF-1 α (Wyrebeck *et al.*, 2011). Es probable que sean la misma especie, sin embargo se requieren más análisis para probar esta hipótesis.

En referencia a la diferente abundancia de las especies de *Metarhizium*, las especies de este hongo pueden tener mayor o menor capacidad de crecimiento en los diferentes métodos de aislamiento utilizados en este estudio. También es posible que existan en diferente abundancia y por eso es más frecuente encontrar algunas especies que otras, por lo que se requieren análisis adicionales para investigar estas posibilidades.

Nuestro enfoque para aclarar con la crisis morfológica en *M. anisopliae* es explorar métodos para la identificación de especies. La aplicación del criterio de especie biológica, desafortunadamente no es una opción para *Metarhizium*, por tratarse de organismos de reproducción exclusivamente asexual.

Bischoff *et al.*, (2009) consideraron imposible diferenciar aislamientos de *M. brunneum* de *M. anisopliae* basándose en características morfológicas, con la excepción de una presunta mutación de color. A pesar de no poder delimitar los taxones basados en características morfológicas, los datos moleculares respaldan la identificación de este hongo a especie.

En este trabajo utilizamos la secuencia del gen EF-1 α , ya que hasta la fecha, se han sugerido como el marcador más informativo para la identificación

de las especies dentro de *Metarhizium* (Bischoff et al., 2009). Sin embargo Schneider et al. (2011), reportan que haber utilizado primers de la región ITS, los cuales describen como la única herramienta actualmente disponible para la detección y cuantificación altamente específica y rápida de *Metarhizium* en muestras ambientales. Sin embargo el método de identificación utilizada en este trabajo, el cual fue el mismo que Wyrebeck et al. (2011), demuestra que puede ser una herramienta rápida y sencilla, para la identificación del complejo de *Metarhizium*.

Existen pocos estudios que caractericen molecularmente las diferentes especies de *Metarhizium*. Schneider et al. (2011) reportan que la presencia del complejo de *Metarhizium* que nombran como grupo 1 (*M. pinghaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M. brunneum*, *M. lepidiotae*, *M. acridum* y *M. globosum*), han sido reportadas en Europa y Norte América mientras que solo *M. globosum*, *M. acridum* y *M. lepidiotae* han sido reportadas en Australia, Asia, África y/o América del sur.

En México y el mundo existe la necesidad de adoptar un método de identificación molecular estándar para simplificar la comunicación respecto a los estudios con estos organismos. La identificación con el método de patrones de bandas de RFLP podría convertirse en una herramienta confiable para diferenciar especies del complejo *Metarhizium anisopliae*. Esto permitirá asociar características y parámetros biológicos (tales como virulencia) a las diferentes especies del complejo (*M. brunneum*, *M. robertsii*, etc.) y apoyarán una selección mas fundamentada de aislamientos a ser utilizados en proyectos de control biológico.

Diaphorina citri se ha convertido en una gran amenaza para la citricultura mexicana y es por eso que los esfuerzos para su control deben aumentarse. El control biológico es una alternativa valiosa, ya que puede contribuir a mantener a las poblaciones de plagas por debajo del nivel de daño económico, sin ocasionar perjuicios al medio ambiente.

V. LITERATURA CITADA

- AHMED, S., AHMAD, N., and RASOOL, K. R. 2004. Studies on Population Dynamics and Chemical Control of Citrus Psylla, *Diaphorina citri*. Int. J. Agri. Biol: 970-73
- ALBERT., SUSAN., and MANJUNATH, K. 2004. Asian Citrus Psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Fla. Entomol.*: 330-353.
- ALEMÁN, J., BAÑOS, H., y RAVELO, J. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad Huanglongbing: una combinación destructiva para la producción cítrica. Rev. Protección Veg: 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: 227-238.
- ALVES, L. A., LEITE, L. G., and DE OLIVEIRA, D. G. P. 2009. Primeiro registro de *Zoophthora radicans* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) em adultos da ampola-da-erva-mate, *Gyropsylla spegazziniana* Lizer & Trelles (Hemiptera: Psyllidae). Neotrop. Entomol: 697-698.
- ATWAL, A.S., CHAUDHARY J.P., and RAMZAN, M. 1968. Studies on the development and field population of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama (Psyllidae: Homoptera). J. Res. Punjab Agric. Univ : 333-338.

- AUBERT, B., BOVÉ, J.M., and ETTIENE, J. 1980. La lutte contre la maladie du greening des agrumes à l'île de la Réunion. Resultats et perspectives. *Fruits*: 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*: 149-162.
- AVERY, P.B., HUNTER, W.B., HALL, D.G., JACKSON, M.A., POWELL, C.A., and ROGERS, M.E. 2009. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) infection and dissemination of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) under laboratory conditions. *Florida entomol*: 608-611
- BEATTIE, G.A. and SMITH, D. 1993. *Citrus leafminer*, Agfact H2.AE.4. 2nd edition (NSW Agriculture): 6.
- BICHOFF, J.F., REHNER, S.A., and HUMBER, R.A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycology*: 512–530.
- BOVÉ, J.M., CHAU, M., TRUNG, H.M., BOURDEAUT, J., and GARNIER, M. 1996. Huanglongbing (greening) in Viet Nam: Detection of *Liberibacter asiaticus* 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, P.T., and AYRES, A.J. 2008. Several *Liberibacter* and *Phytoplasma* species are individually associated with HLB. Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing, Orlando: 152-155.

- BURCKHARDT, D., and OUVRARD, D. 2012 A revised classification of the jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea). Zootaxa: 1–34.
- BURGUES, H. D., HUSSEY, N. M. 1971. Microbial control of Insects and Mites. Ed. Acad. Press London: 623-636.
- 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 *Hirsutellacitriformis* Speare sobre *Diaphorina citri* Kuw. (Homoptera: Psyllidae) en cítricos de Cuba. IV Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, Varadero, Cuba. Revista de Protección Vegetal: 199-201.
- 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., and 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, México.
- CASTELÁN, A. J., 2010. HLB de los cítricos: principales acciones fitosanitarias para su control. Agroentorno: 47-48.

- CERMELI, M., MORALES, P., AND GODOY, F. 2000. Presencia del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en Venezuela. Boletín Entomología Venezolana: 235-243.
- CHIEN, C.C., CHIU, S.C., and KU, S.C. 1989. Biological control of *Diaphorina citri* in Taiwan. Fruits: 404-407.
- CHIEN, C.C., CHIU, S.C., and KU, S.C. 2001. Mass rearing and field release of Aneulophid wasp. <http://www.agnet.org/library/tn/2001005/> (June, 2011).
- CHILDERS, C. C., AND 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: 49-53.
- CHIOU-NAN, C. 1998: Ecology of the Insect Vectors of Citrus Systemic Diseases and Their Control in Taiwan. FFTC Publication Database; 1998. (Consultado: Junio 2011). <http://www.agnet.org/library/eb/459a/>
- COBELO, L. 2005. Un citrus sin intrusos. (Consultado: Marzo, 2013) <http://www.clarin.com/suplementos/rural/2005/09/24/rA-00411.htm>
- COELHO, M.V., and MARQUES, A. 2002 "Citrus greening" Um bacteriose uarentenária que representa ameaça potencial à citricultura brasileira. Comunicado Técnico 58. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abasteciment: 4.
- CORONADO B., RUIZ C., NICOLAEVNA, M.S., and GAONA-GARCÍA, G. 2003. *Tamarixia* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoide del psílido asiático de los cítricos en Tamaulipas, México. En: Memorias del XXVI Congreso Nacional de Control. Biológico. Noviembre de 2003, Guadalajara, Jalisco, México: 71-73.

CORTEZ-MONDACA, E., LOERA-GALLARDO, J., HERNÁNDEZ-FUENTES, L.M., BARRERA-GAYTAN, J.F., FONTES-PUEBLA, A.A., DÍAZ-ZORRILLA, U., JASSO-ARGUMEDO, J., REYES-ROSAS, M.A., MANZANILLA-RAMÍREZ, M.A., y LÓPEZ-ARROYO, J.I. 2013 Manual para el Uso de Insecticidas Convencionales y Alternativos en el Manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama en Cítricos, en México. 65 pp.

DA GRACA, J.V. 1991. Citrus greening disease. Annu. Rev. Phytopathol: 109-136.

DA GRACA, J.V., and KORSTEN, L. 2004. Citrus huanglongbing: Review, present status and future strategies. In: S.A.M.H. Naqvi (ed.) Diseases of fruits and vegetables, Vol. 1. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands: 229-245.

DAHIYA, K.K., LAKRA, R.K., DAHIYA, A.S., and SINGH, S.P. 1994. Bioefficacy of some insecticides against citrus psylla, *Diaphorinacitri* kuwayama (Psyllidae: Hemiptera). Crop Res. Hisar, India: 137-40.

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: 137-140.

DUPERCHY, E. 2003. Identification of up-regulated genes of the hyphomycete *Beauveria bassiana*, during the infection of *Leptinoptarsadicemlineata*. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania: 111.

- EILENBERG, J. 2002. Biology of fungi from the order Entomophthorales. The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen, Denmark: 407
- EPPO. 2007. Database on Quarantine pest. *Diaphorina citri*. (En línea). Disponible en http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Diaphorina_citri/DIAACI_ds.pdf. (Consulta: 15-12-12).
- ETIENNE, J., QUILICI, S., MARIVAL, D., and FRANCK, A. 2001. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera, Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixiaradiata* (Hymenoptera, Eulophidae). *Fruits*: 307-315.
- FERNÁNDEZ, MIRIAM y MIRANDA, ILEANA .2005. Comportamiento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Parte I: Características morfológicas, incidencia y enemigos naturales asociados. *Rev. Protección Veg*: 27-31.
- FERNÁNDEZ, MIRIAM y MIRANDA, ILEANA. 2005. Comportamiento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Parte III: Relación entre el ciclo de vida y el brote vegetativo foliar. *Rev. Protección Veg*: 161-164.
- FERRON, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*. pp. 409-442.
- FERRON, P., FARGUES, J., and 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: 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.
- GARCÍA, C. (2006): Huanglongbing (HLB Greening). Dirección de Vigilancia y Monitoreo. (En línea). Disponible en <http://www.senasa.gov.ar> (Consulta: 16-12-12).
- 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., AND RODRÍGUEZ, M. S. 2003. Formulación de biopesticidas con hongos entomopatógenos. INIA Tierra Adentro: 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.
- GONZALES, C., BORGES, M., HERNANDEZ, D., RODRIGUEZ, J. 2003. Inventory of natural enemies of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Cuba. Proc. International Soc. Citriculture.: 859.
- 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.
- 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.

- GRAVENA, S., BERETTA, M. J. G., PAIVA, P. E. B., GALLAO, R. and YAMAMOTO, P. T. 1996. Seasonal abundance and natural enemies of *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae) in citrus orchards of Sao Paulo State, Brazil, In. J. V. da Graca, P. Moreno, and R. K. Yoomi (eds.), Proc. 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologist (IOCV):414.
- HAJECK, A.E. and ST. LEGER, R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annual Review of Entomology: 293-322.
- 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. Flo. Entomol: 330-352
- HALL, D. G. 2008. Biology, History and World Status Of *Diaphorinacitri* | Taller Internacionales sobre Huanglongbing de los cítricos (Candidatus Liberibacter spp.) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). Hermosillo, Sonora, México.
- HEALE, J. B., ISAAC, S., and CHAN DLER, D. 1989. Prospect for strain improvement in entomopathogenic fungi. Pesticides Science: 79-92.
- HUANG, C.H., TSAI, M.Y., y WANG, C.L. 1984. Transmission of citrus likubin by a psyllid, *Diaphorina citri*. *J. Agric. Res. China*: 15-72.
- HUMBER, R. A. 1981. An alternative view of certain taxonomic criteria used in the Entomophthorales (zygomycotina). Mycotaxon (13). USA: Mycotaxon, 1981. pp. 191-240.

- HUNG, T.H., HUNG, S.C., CHEN, C.N., HSU, M.H., and 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*: 96-102.
- HUSAIN, M.A. and D. NATH. 1927. The citrus psylla (*Diaphorina citri*, Kuw.) (Psyllidae: Homoptera). *Memoirs of the Department of Agriculture India*: 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.
- JANKEVICA, L. 2004. Ecological associations between entomopathogenic fungi and pest insects recorded in Latvia. *Latvia Entomol*: 60-65.
- 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*: 23-30.
- KOUASSI, M. 2001. Les possibilités de la lutte microbiologique en phase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. *Universidad de Québec, Montreal, Canada. Vertigo. La revista en ciencias ambientales de la web*. 2.
- LACEY, L.A. and GOETTEL, M. 1995. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. *Entomophaga*: 3-27.
- LACEY, L.A., FRUTOS, R., KAYA, H.K., and VAIL, P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biological Control*: 230-248.

- LECUONA, R., PAPIEROK, B., and RIBA, G. 1996. Hongos entomopatógenos. En: Lecuona, R. (Ed.) Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plagas. Mariano Talleres Gráficos, Buenos Aires: 35-60.
- LIU, Y.H. and TSAI, H. 2000. Effect of the temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Ann. Appl. Biol.*: 201-216.
- LLORENS, J.M. 2007. Biología de los enemigos naturales de las plagas de cítricos y efectos de los productos fitosanitarios. Dossiers Agraris ICEA Enemicsnaturals de plagues en diferentscultius Catalunya. (En línea). <http://www.raco.cat/index.php/DossiersAgraris/article/viewPDFInterstitial/19942/19782>. (Consulta: 13-11-12).
- LÓPEZ-ARROYO, J.I., PEÑA, M.A., ROCHA-PEÑA, M.A., and LOERA, J. 2004. Occurrence of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Mexico, pp. 179. In: XI Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Abstracts. November 2004. Monterrey, Nuevo León, México.
- LÓPEZ-ARROYO, J.I., PEÑA, M.A., ROCHA-PEÑA, M.A., and LOERA-GALLARDO, J. 2005. Occurrence of the Asiatic citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Mexico. In: *Proc. 16th Conf. IOCV*, 508. IOCV, Riverside, CA.
- LÓPEZ-ARROYO, J.I., DE LEÓN, T., RAMÍREZ, M., y LOERA, J. 2008. Especies de *Chrysoperla* (Neuroptera: Chrysopidae) presentes en México. pp. 69-80. In: M.D. Salas y E. Salazar (eds.) *Entomófagos en*

el control de plagas agrícolas en México. Universidad Autónoma de Guanajuato. Guanajuato, Méx.

LÓPEZ L.V., and HANS BÖRJE, J. 2001. Biodiversidad del suelo: control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos. Cuaderno de Biodiversidad: 12 – 15.

MA COY, C.W., SAMSON, R.A., and BOUCIAS, D.G. 1988. 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:151-236.

MARUTANI H. M., HUNTER W. B., and HALL D. G., 2009. Establishment of Asian Citrus psyllid (*Diaphorina citri*) primary cultures. In vitro cellular developmental biology Animal: 317-320.

MCFARLAND, C. and HOY, M. 2001. Survival of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), and its two parasitoids, *Tamarixiaradiata* (Hymenoptera: Eulophidae) and *Diaphorencyrtusaligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae), under different relative humidities and temperature regimes. Flo. Entomol: 227-233.

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: 101-109.

MICHAUD J. P. 2004. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in Central Florida. Biological Control 29: 260-269.

- MICHAUD, J. P. 2002. Biological control of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Florida: a preliminary report. Entomol.News: 2169-223.
- MICHAUD, J. P., AND L. E. OLSEN. 2004. Suitability of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, as prey for ladybeetles. BioControl: 417-431.
- MICHAUD, J.P. 2001. Numerical response of *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae) to infestations of Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) in Florida. Flo. Entomol: 608-612.
- MOLL, J. N., and VAN VUUREN, S. P.1977.Greening disease in Africa.Prot. Intl. Soc. Citricult: 903-912.
- MONZON, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica: 95-103.
- NAVA, D. E., TORRES, M. L. G., RODRIGUES, M. D. L., BENTO, J. M. S., and PARRA., J. R. P. 2007. Biology of *Diaphorina citri* (Hem.,Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. J. Appl. Entomol.: 709-715.
- OROZCO, S. S. 1995. Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México, Universidad Autónoma Chapingo,México. 150 pp.
- PELL, J.K., EILENBERG, J., HAJEK, A.E., and 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.

- PLUKE, W.H.R., ESCRIBANO, A., MICHAUD, J.P., and STANCY, P.A. 2005. Potencial impact of Lady Beetles on *D. citri* (Homoptera: Psyllidae) in Puerto Rico. Flo. Entomo: 123-128.
- PRISCHEPA, L., MIKULSKAYA, L., and GERASIMOVICH, M. 2011. Diversity of entomopathogenic microorganisms in pest populations of Bialowieza forest stands. Vytauto Didžiojo universiteto Botanikos sodo raštai : 72-81.
- 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: 10-12.
- PUCHETA D. M., FLORES M.A., RODRÍGUEZ N. S., and DE LA TORRE M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Interciencia: 856-860.
- QUESADA-MORAGA, E. 2002. Los hongos entomopatógenos en el control de las plagas de insectos. Phytoma España: 41-48.
- QUESADA-MORAGA, E. and SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. 2000. Rearing and breeding of the Mediterranean locust *Docistaurus maroccanus* under laboratory conditions. Journal of Applied Entomology: 121-124.
- RAE, D.J., LIANG, W.G., WATSON, D.M., BEATTIE, G.A., and HUANG, M.D. 1997. Evaluation of petroleum spray oils for control of the Asian citrus psylla, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Homoptera: Psyllidae), in China. Intern J Pest Management.: 71-75.
- RIVERO ARAGON, A., and H. GRILLO-RAVELO. 2000. Natural enemies of *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) in the central region of Cuba. Centro-Agrícola: 87-88 (solo resumen).

- ROBERTS, D.W. and 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: 35-45.
- ROY, E.H, STEINKRAUS D. C., EILENBERG, J., HAJEK, A.E., and PALL, J. K. 2006. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. Annu Rev Entomol: 331-57.
- RUIZ C., E., J.M., CORONADO, B., and MYARTSEVA, S.N. 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: 329-32.
- SAMSON, R.A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. Stud. Mycol: 1-119.
- SENASICA, 2008. Manual técnico para la detección y manejo del huanglongbing de los cítricos.
- SENASICA, 2010. 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>

SENASICA, 2013. Situación fitosanitaria nacional (HLB) (consulta 15-05-13) <http://www.senasica.gob.mx/?id=4608>

SÁNCHEZ-PEÑA, S.R., CASIQUE-VALDÉS, R., SÁNCHEZ-LARA, B.M., EK-MAAS, J.N., HERNÁNDEZ-GUERRA, C., CURTI-DIAZ, S.A., LOREDO-SALAZAR, X., and LÓPEZ-ARROYO, J.I. 2011. Field Application of Entomopathogenic fungi against *Diaphorina citri* in Martínez de la Torre, Veracruz, Mexico. 2° Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México.

SHAH, P.A., and 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>

SHIVANKAR, V.J., RAO, C.N., SHYAM, S., and SINGH, S. 2000. Studies on citrus psylla, *Diaphorina citri* kuwayama: a review. Agric. Rev: 199-204.

TANADA, Y., and KAYA, H. 1993. Insect Pathology. Academic Press. San Diego, California (USA). 666 pp.

TRUJILLO-ARRIAGA J. 2010. Situación actual, regulación y manejo del HLB en México. 2° Taller internacional sobre el Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos. Mérida, Yucatán, México.

- TSAI J.H., and LIU, Y.H. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. University of California, Riverside. J. Economic Entomology: 1721-1725.
- URTUBIA I. H., and FRANCE A.I. 2007. Formulación de hongos entomopatógenos para control de plagas en agricultura. INIA Tierra Adentro, Noviembre-Diciembre: 46-49.
- VÉLEZ, P.A., POSADA, F.J., MARIN, P., GONZALEZ, M.T., OSORIO, E., and BUSTILLO, A.E. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Investigaciones del café. Boletín Técnico No. 17. 37pp.
- VILLACARLOS, L., AND WILDING, N. 1994. Four new species of Entomophthorales infecting the leucaena psyllid *Heteropsylla cubana* in the Philippines. Mycol. Res. 98 (2): 53-164.
- VILLAGÓMEZ-ALMANZA J., G. REYES-MARTÍNEZ y S. DÍAZ-GONZÁLEZ. 2010. Plan estratégico para mitigar el impacto del huanglongbing (HLB) sobre la citricultura del estado de Colima. VI Simposio Internacional Citrícola y 1er. Simposio Internacional sobre Mejoramiento Genético de Cítricos. 4 - 6 de Noviembre de 2010. Tecomán, Col. México.
- VOLCY, C., and PARDO, V. 1994. Principios de Micología. Centro de Publicaciones, Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. 141 pp.
- WANG, L.Y., HUNG, S.C., HUNG T.H., and SU, J. 1996. Population fluctuations of *Diaphorina citri* kuwayama and incidence of citrus liqubin in citrus orchards in chaiyi area. Pl. Protect. Bull., Taipei: 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: 715-722.
- WENNINGER, E.J., HALL, D.G., and MANKIN, R. W. 2009. Vibrational communication between the sexes in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). Annals.Entomol.Soc. America: 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 pp.
- WRAIGHT, S.P., JACKSON, M.A., and 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. pp. 253-287. www.vertigo.uqam.ca/.../mathias_de_kouassi.html (consulta 06-06-11).
- XIE, P.H., SU, C. and LIN, Z.G. 1988. A preliminary study on an entomogenous fungus [*Verticillium lecanii*] of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hom.:Psyllidae). Chin. J. Biol. Control: 92.
- XU, C. F., XIA, Y.H., LI, K.B., and KE, C. 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: 100-108.