



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Identificación de hongos entomopatógenos de *Diaphorina citri* Kuwayama, en los departamentos del Valle del Cauca y Quindío, Colombia**

**Yenmy Josué Ramos Delgado**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Escuela de Posgrados  
Palmira, Colombia

2016



# Identificación de hongos entomopatógenos de *Diaphorina citri* Kuwayama, en los departamentos del Valle del Cauca y Quindío, Colombia

**Yenmy Josué Ramos Delgado**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias Agrarias, Protección de Cultivos.**

Directores:

M.Sc., Alberto Rojas Triviño

Ph.D., María del Rosario Manzano

Línea de Investigación:

Protección de Cultivos

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Escuela de Posgrados  
Palmira, Colombia

2016



*Dedicatoria*

*A mi padre Omar Augusto Ramos G.*

*A mi madre Ligia María Delgado.*

*Y a mis hijos Santiago y Samay.*



## **Agradecimientos**

El autor expresa sus agradecimientos al Instituto Colombiano Agropecuario ICA, Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, así como también al Ingeniero, Jorge Hernán Palacino, líder del proyecto de HLB, ICA seccional Quindío, al M.Sc. Andrés Mauricio Campuzano, a la M.Sc. Eliana Andrea Rincón, a la señora Rosalba Tobón, a la M.Sc. Alexandra Sierra, a la Ph.D. Andrea Amalia Ramos Portilla, a la señora Olga Molina, técnico de campo del ICA, al profesor Mario Augusto García, al M.Sc. Rubén Pantoja y demás personas y entidades que participaron en la realización de la tesis.



## Resumen

El psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae) es una plaga distribuida ampliamente en Colombia y es el vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp., agente causante del Huanglongbing (HLB); La enfermedad está presente en Colombia, reportada por el ICA en el 2015, en los municipios de Distracción y Fonseca (Guajira). El uso de enemigos naturales como hongos entomopatógenos, es una alternativa viable para la disminución de las poblaciones de esta plaga. El objetivo de la investigación consistió en identificar hongos entomopatógenos de *D. citri*, en cultivos de cítricos y plantas de *Murraya paniculata* (L.) Jacq, en los departamentos de Quindío y Valle del Cauca. Se colectaron insectos micosados, se aislaron, purificaron e identificaron molecularmente los hongos mediante el análisis de la región ITS del ADNr. El trabajo se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico fitosanitario de ICA Palmira. Se aislaron ocho cepas de hongos entomopatógenos, correspondientes a las especies *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. En las pruebas de patogenicidad en condiciones de laboratorio se obtuvo una mortalidad en ninfa y adultos de *D. citri* del 80 y 56%, respectivamente y una mortalidad de adultos de *D. citri* sobre plántulas de *M. paniculata* de 15%. Los hongos aislados representan un gran potencial como nueva alternativa de manejo del insecto.

**Palabras clave:** Huanglongbing, psílido, *Candidatus Liberibacter* spp., *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, ITS, ADNr, hongo entomopatógeno.

## Abstract

The Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae) is a pest that is widely distributed in Colombia and is the vector of transmission of the bacterium *Candidatus Liberibacter* spp, which causes Huanglongbing (HLB), The disease present in Colombia, reported by the ICA in 2015, in the municipalities of Distracción and Fonseca (Guajira). The use of natural enemies such as entomopathogenic fungi is a viable alternative for the reduction of pest population. The aim of the research was to identify entomopathogenic fungi *D. citri*, in the departments of Quindio and Valle del Cauca. Fungi infested insects were collected and isolated, purified and identified molecularly fungi by analyzing the ITS region ADNr. The work was performed at the Laboratory of Plant Health Diagnostic Palmira ICA. Eight strains of entomopathogenic, corresponding to the genera *Metarhizium* and *Beauveria* fungi were isolated. Pathogenicity in nymphs and adults, in laboratory conditions with average mortality of 80 and 56% respectively and adult mortality in mirto seedling with an average of 15% was evaluated. Fungal isolates represent great potential as new insect management alternative.

**Keywords:** Huanglongbing, psyllid, *Candidatus Liberibacter* spp., *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, ITS, ADNr, entomopathogenic fungi

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XV</b>
<b>Lista de Símbolos y Abreviaturas</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Objetivos y Marco Teórico</b> .....	<b>5</b>
1.1 Objetivo General .....	5
1.1.1 Objetivos específicos .....	5
1.2 Marco Teórico .....	5
1.2.1 Clasificación Taxonómica de <i>Diaphorina citri</i> .....	8
1.2.2 Biología de <i>Diaphorina citri</i> .....	8
1.2.3 Características Morfológicas de <i>Diaphorina citri</i> .....	9
1.2.4 Distribución mundial de <i>Diaphorina citri</i> .....	14
1.2.5 Plantas hospederas de <i>Diaphorina citri</i> .....	16
1.2.6 Importancia económica de <i>Diaphorina citri</i> .....	16
1.2.7 Control químico de <i>Diaphorina citri</i> .....	17
1.2.8 Control biológico por parasitoides y depredadores .....	19
1.2.9 Control biológico con hongos entomopatógenos.....	20
1.2.10 Clasificación Taxonómica de <i>Candidatus Liberibacter</i> .....	22
1.2.11 Especies asociadas al Huanglongbing.....	23
1.2.12 Rango de hospedantes de <i>Candidatus Liberibacter</i> .....	24
1.2.13 Interacción bacteria – vector .....	25
1.2.14 Síntomas de la enfermedad .....	25
1.2.15 Manejo de la enfermedad .....	26
1.2.16 Hongos entomopatógenos .....	27
1.2.17 Modo de acción de los hongos entomopatógenos .....	28
1.2.18 Clasificación taxonómica: Género <i>Beauveria</i> .....	30
1.2.19 Clasificación taxonómica: Género <i>Metarhizium</i> .....	31
1.2.20 Reacción en cadena de polimerasa (PCR) .....	33
1.2.21 Regiones Espaciadoras Internas Transcritas (ITS).....	33
1.2.22 Genes que codifican el ARN ribosomal.....	34
<b>2. Identificación de aislados y caracterización de la patogenicidad</b> .....	<b>37</b>
2.1 Metodología .....	37
2.1.1 Localización.....	37

XII Identificación de hongos entomopatógenos de *Diaphorina citri* Kuwayama, en los departamentos del Valle del Cauca y Quindío, Colombia

---

2.1.2	Muestreo de <i>D. citri</i> .....	37
2.1.3	Colecta de insectos muertos de <i>D. citri</i> .....	38
2.1.4	Aislamiento de hongos a partir de adultos muertos de <i>D. citri</i> .....	39
2.1.5	Elaboración de cultivos monospóricos.....	40
2.1.6	Selección de hongos entomopatógenos.....	41
2.1.7	Caracterización e Identificación morfológica.....	41
2.1.8	Identificación molecular de los hongos entomopatógenos: Extracción de ADN	42
2.1.9	Amplificaciones mediante PCR .....	42
2.1.10	Re-aislamiento y conservación de los hongos entomopatógenos.....	44
2.1.11	Cría de adultos de <i>Diaphorina citri</i> .....	44
2.1.12	Multiplicación de plantas de Mirto ( <i>Murraya paniculata</i> ) .....	44
2.1.13	Prueba de patogenicidad de los hongos entomopatógenos en ninfas y adultos de <i>Diaphorina citri</i> en condiciones de laboratorio.....	46
2.1.14	Prueba de patogenicidad de los hongos entomopatógenos en adultos de <i>D. citri</i> en plántulas de <i>M. paniculata</i> .....	47
2.1.15	Diseño estadístico .....	49
2.2	Resultados.....	49
2.2.1	Identificación de aislamientos de hongos entomopatógenos .....	51
2.2.2	Porcentaje de mortalidad en ninfas de <i>D. citri</i> en condiciones de laboratorio .....	57
2.2.3	Porcentaje de mortalidad en adultos de <i>D. citri</i> en condiciones de laboratorio.....	59
2.2.4	Porcentaje de mortalidad en ninfas y adultos de <i>D. citri</i> en las dos localidades.....	62
2.2.5	Mortalidad promedio de adultos <i>D. citri</i> , sobre plántulas de <i>M. paniculata</i> .....	65
2.3	Discusión .....	67
<b>3.</b>	<b>Conclusiones y Recomendaciones .....</b>	<b>81</b>
3.1	Conclusiones .....	81
3.2	Recomendaciones .....	82
<b>A.</b>	<b>Anexo: Fincas muestreadas en el departamento del Quindío. 2013.....</b>	<b>83</b>
<b>B.</b>	<b>Anexo: Fincas muestreadas en el departamento del Valle del Cauca. 2013 .....</b>	<b>85</b>
<b>C.</b>	<b>Anexo: Cercos muestreadas en el departamento del Valle del Cauca. 2013 .....</b>	<b>87</b>
<b>D.</b>	<b>Anexo: Descripción y georreferenciación de las fincas donde se colectaron insectos muertos de <i>D. citri</i>, en los departamentos de Valle del Cauca y Quindío. 2013 .....</b>	<b>89</b>
<b>E.</b>	<b>Anexo: ADN total visualizado sobre gel de agarosa al 0.8%. Carril MP: marcador de peso molecular (100pb), carril 5-8 de ADN de las cepas 1. CQCaney1, 2. CQCaney 3, 3. CV Castillo 2 y 4. CV Primavera 1, aislados de adultos de <i>D. citri</i>.....</b>	<b>91</b>
<b>F.</b>	<b>Anexo: Visualización de la Amplificación por PCR con cebadores ITS 1e ITS 4, Sobre gel agarosa 1.2%, marcador de peso molecular (100pb) Labder, carril 1- 4, marcador de peso molecular (100pb) fermentas carril 5- 8: amplificados de la región ITS 1e ITS 4 de los hongos entomopatogenos aislados de adultos de <i>D. citri</i>.....</b>	<b>93</b>
<b>G.</b>	<b>Anexo: Secuencias editadas de los hongos <i>B.bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> .....</b>	<b>95</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>97</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1:</b> Huevos del psílido asiático de los cítricos <i>D. citri</i> Kuwayama .....	9
<b>Figura 1-2:</b> Estados ninfales del psílido asiático de los cítricos <i>D. citri</i> .....	10
<b>Figura 1-3:</b> Habitus lateral del macho adulto de <i>D. citri</i> .....	12
<b>Figura 1-4:</b> Estructura genital de <i>D. citri</i> .....	12
<b>Figura 1-5:</b> Adulto del <i>psílido</i> asiático de los cítricos <i>D. citri</i> Kuwayama. ....	13
<b>Figura 1-6:</b> Distribución geografía del psílido asiático del <i>D. citri</i> en Colombia. ....	15
<b>Figura 1-7:</b> Esquema del desarrollo de un hongo entomopatógeno (modificado de Vilcinskis; Gotz, 1999).....	30
<b>Figura 1-8:</b> Diagrama de ubicación de las regiones ITS en el ribosoma.....	33
<b>Figura 2-1:</b> Muestreo de adultos micosados en árboles de cítricos.....	38
<b>Figura 2-2:</b> Características de los adultos aparentemente micosados colectados en campo. ....	39
<b>Figura 2-3:</b> Materiales utilizados para las pruebas de patogenicidad de los hongos. ....	47
<b>Figura 2-4</b> Plantas de mirto ( <i>M. paniculata</i> ) utilizadas en el bioensayo en adultos de <i>D. citri</i> . ....	48
<b>Figura 2-5:</b> Mapa del departamento del Quindío (Colombia) con la geo posición de los predios muestreados.....	50
<b>Figura 2-6</b> Mapa del departamento del Valle del Cauca con la geo posición de los predios muestreados.....	51
<b>Figura 2-7:</b> Estructuras microscópicas del hongo <i>B. bassiana</i> . ....	52
<b>Figura 2-8:</b> Estructuras microscópicas del hongo <i>M. anisopliae</i> . ....	53
<b>Figura 2-9:</b> Hongos entomopatógenos, generos <i>Beauveria</i> y <i>Metarhizium</i> aislados de adultos de <i>D. citri</i> muertos.....	53
<b>Figura 2-10:</b> Dendrograma de las secuencias del hongo <i>B. bassiana</i> empleando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Tamura - Nei, con un modelo de 1000 Bootstrap.....	55
<b>Figura 2-11:</b> Dendrograma de las secuencias del hongo <i>M. anisopliae</i> empleando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Tamura - Nei, con un modelo de 1000 Bootstrap.....	56
<b>Figura 2-12;</b> Ninfas de <i>D. citri</i> infectadas con hongos entomopatógenos después de 5 días de inoculación bajo condiciones de laboratorio.....	58
<b>Figura 2-13:</b> Adultos infectados con hongos entomopatógenos después de 6 días de la aspersión bajo condiciones de laboratorio.....	61

<b>Figura 2-14:</b> Porcentaje de mortalidad de ninfas de <i>D. Citri</i> ( $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $75 \pm 3\%$ HR, Palmira, 2014).....	62
<b>Figura 2-15:</b> Porcentaje de mortalidad de adultos de <i>D. Citri</i> ( $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $75 \pm 3\%$ HR, Palmira, 2014).....	62
<b>Figura 2-16:</b> Porcentaje de mortalidad de <i>D.citri</i> por estado de desarrollo del insecto....	64
<b>Figura 2-17:</b> Porcentaje de mortalidad de adultos de <i>D. citri</i> en las dos localidades sobre plantas de mirto ( <i>M. paniculata</i> ). .....	66

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 2-1:</b> Identificación molecular de los aislamientos a partir de adultos muertos de <i>D. citri</i> con la extracción del ADNr y la comparación de secuencias con el algoritmo BLAST .....	54
<b>Tabla 2-2:</b> Porcentaje de mortalidad de ninfas de <i>D. citri</i> , colectadas en el departamento del Quindío e inoculadas con las cepas aisladas de adultos muertos de <i>D. citri</i> , ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y $75 \pm 3\%$ HR, Palmira, 2014). .....	57
<b>Tabla 2-3:</b> Porcentaje de mortalidad de ninfas de <i>D. citri</i> , colectadas en el departamento del Valle del Cauca, e inoculadas con las cepas aisladas a partir de adultos muertos de <i>Diaphorina citri</i> , ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y $75 \pm 3\%$ HR, Palmira, 2014). .....	58
<b>Tabla 2-4:</b> Porcentaje de mortalidad de adultos de <i>D. citri</i> procedentes del Quindío e inoculados con cepas aisladas de adultos muertos de <i>Diaphorina citri</i> , ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y $75 \pm 3\%$ HR, Palmira, 2014). .....	59
<b>Tabla 2-5:</b> Porcentaje de mortalidad de adultos de <i>D. citri</i> colectados en el Valle del Cauca e inoculados con cepas aisladas de adultos muertos de <i>Diaphorina citri</i> , ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y $75 \pm 3\%$ HR, Palmira, 2014). .....	60
<b>Tabla 2-6:</b> Porcentaje de mortalidad de <i>D.citri</i> , con relación al estado de desarrollo del insecto y la localidad evaluada ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y $75 \pm 3\%$ HR, Palmira, 2014). .....	63
<b>Tabla 2-7:</b> Porcentaje de mortalidad promedio de adultos de <i>D. citri</i> procedentes del departamento del Quindío, sobre plántulas de <i>M. paniculata</i> . ( $27^\circ\text{C}$ . y $75\%$ HR, Palmira, 2014). .....	65
<b>Tabla 2-8:</b> Porcentaje de mortalidad promedio de adultos de <i>D. citri</i> procedentes del departamento del Valle del Cauca, sobre plántulas de <i>M. paniculata</i> . ( $27^\circ\text{C}$ . y $75\%$ HR, Palmira, 2014). .....	66

## Lista de Símbolos y Abreviaturas

<b>Símbolo</b>	<b>Término</b>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de Varianza.
cc	Centímetros cúbicos
g	Gramos
Ha	Hectárea
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (Espaciador Interno Trascrito)
L	Libros
LSU	<i>Large Subunit</i> (Subunidad grandes del ARNr).
mm	Milímetros
ng	Nanogramos
PCR	Reaccion en Cadena de polimerasa
SSU	<i>Small Subunit</i> (Subunidad pequeña del ARNr.)
T	Tonelada
μL	Microlitro

# Introducción

La producción de cítricos de los departamentos del Valle del Cauca, Antioquia, Quindío, Risaralda y Caldas, representan el 72% de la producción nacional. El área sembrada es aproximada de 38.000 ha, con un rendimiento promedio de 17,0 toneladas/ha (SEA, 2013). Entre las especies de Rutaceas más cultivadas y que ocupan la mayor superficie de producción se encuentra la mandarina *Citrus reticulata* Blanco, la naranja *Citrus sinensis* (L.) Osbeck y el limón *Citrus limon* (L.) (SEA, 2013).

Actualmente la citricultura colombiana se encuentra en emergencia fitosanitaria (Resolución ICA 2390 de 2015) por la presencia de adultos de *Diaphorina citri* Kuwuyama, infectados con la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, en los municipios de Distracción y Fonseca (Guajira) y se declaró la cuarentena fitosanitaria al departamento de la Guajira, por la presencia de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* en tejido vegetal (Resolución ICA, 4713 de 2016), causante de Huanglongbing (HLB). Es una enfermedad devastadora que ocasiona daño en los brotes al deformar las hojas, así como enanismo y disminución en la calidad de la fruta, disminución de la producción, hasta la eliminación total de los cultivos (Capoor; Rao; Viswanath, 1974).

En Colombia, su vector, el psílido asiático de los cítricos *D. citri*, se registró por primera vez en el año 2007 asociado a un huerto de lima tahití, (*Citrus latifolia* Tanaka), en la vereda Agua Blanca en el Espinal (Tolima) (King et al., 2008). Se encuentra distribuido en casi todas las zonas cítricas del país (ICA, 2014). Este insecto está muy asociado a plantas de la familia Rutaceae, de los géneros *Citrus* y *Murraya* y las especies *Swinglea glutinosa* Murray, *Limonia acidissima* L. y *Citropsis schweinfurthii* Swingley Kellerm (Halbert; Manjunath, 2004).

La longevidad del adulto de *Daphorina citri* oscila entre tres a cuatro meses aproximadamente. Las hembras tienen un periodo de oviposición de 12 días, donde pueden ovipositar hasta 800 huevos, los cuales eclosionan a los 3 días. El ciclo completo

## 2 Identificación de hongos entomopatógenos de *Diaphorina citri* Kuwayama, en los departamentos del Valle del Cauca y Quindío, Colombia

---

oscila entre 15 y 47 días, dependiendo de factores como la temperatura y la humedad, pueden existir hasta 11 generaciones por año (Yang et al., 2006). El rango óptimo de desarrollo para *D. citri* está entre 25 a 28 °C. Temperaturas menores a 17°C y mayores a 31°C, afectan el ciclo de vida (Ortiz Reyes et al., 2014).

Las ninfas y los adultos son herbívoros y cuando las poblaciones son altas, especialmente las ninfas, causan daño directo al extraer grandes cantidades de sabia del floema de los brotes, o por los excrementos, que contribuyen a la reducción del área fotosintética y al favorecimiento de condiciones a otros agentes nocivos como los hongos que se desarrollan en el follaje. El daño indirecto se debe a que es uno de los principales vectores junto con *Trioza erytreae* (Hemiptera: Triozidae) de la enfermedad “Huanglongbing” (HLB), cuyo agente causal es una bacteria que habita en el floema. Las plantas infectadas no llegan a vivir más de cinco a ocho años (Ebratt-Ravelo, 2009).

Colombia presenta varios limitantes para el control de *D. citri*, especialmente por no contar con estrategias basadas en el concepto de manejo integrado de plagas, poca asistencia técnica calificada y manejo tradicional de los cultivos (Rodríguez, 2012). En los sistemas de control actuales, es frecuente el uso de insecticidas químicos como imidacloprid, clorpirifox, metamidofos, dimetoato, lo cual genera desafortunadamente la eliminación de enemigos naturales, desorientación y disminución de colonias de polinizadores y contaminación del medio ambiente (Leal, 2009). El uso de hongos entomopatógenos para el control de *D. citri* es una alternativa viable dentro de los programas de manejo integrado de este insecto.

Teniendo en cuenta la importancia de *D. citri* y el riesgo potencial de dispersión del Huanglongbing a los demás departamentos citrícolas de Colombia, el presente trabajo planteó la búsqueda de hongos controladores que afecten de forma natural a los psilidos presentes en los cultivos de cítricos del Valle del Cauca y Quindío, mediante el aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos provenientes de adultos muertos de *D. citri* infectados en campo. Se realizó la identificación de ocho aislamientos que correspondieron a dos especies de hongos entomopatógenos. La identificación molecular de los aislamientos se hizo con la secuenciación de la región ITS, que es ahora tal vez la región del ADN ribosomal más ampliamente estudiada debido a su mayor

grado de variación que en otras regiones génicas de ADN recombinante (SSU y LSU) (Baldwin et al., 1995). Se identificaron los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Balsamo) y *Metharizium anisopliae* (Metschnikoff). La patogenicidad de los hongos aislados se evaluó tanto en ninfas como en adultos del psílido en condiciones de laboratorio y sobre plantas de *M. paniculata*. El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario del ICA Palmira.

Se espera que los resultados obtenidos en esta investigación sirvan como elementos que contribuyan en el manejo de *D. citri*, presente en los sistemas productivos citrícolas y como otra de las alternativas que se pueda articular dentro del manejo integrado de plagas, en condiciones de campo.



# 1. Objetivos y Marco Teórico

## 1.1 Objetivo General

Identificar hongos entomopatógenos para el control del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*, en las zonas citrícolas del Valle del Cauca y Quindío, Colombia.

### 1.1.1 Objetivos específicos

- Identificar las especies de hongos entomopatógenos aislados de adultos de *Diaphorina citri* de los departamentos del Valle del Cauca y Quindío.
- Caracterizar la patogenicidad de los hongos entomopatógenos aislados contra *Diaphorina citri*.

## 1.2 Marco Teórico

Una especie invasora como *D. citri*, es aquella especie exótica que ha sido introducida accidental o intencionalmente en nuevas áreas geográficas y que tiene la capacidad de colonizar, invadir y persistir; su introducción y dispersión amenazan la diversidad biológica, causando daños al ambiente y a la economía (Sakai et al., 2001). Las especies invasoras introducidas súbitamente pueden encontrarse en una condición de gran ventaja frente a las especies nativas. Es decir, los mecanismos de defensa de las especies nativas son limitados o están del todo ausentes para enfrentar a las especies introducidas (Serra; Andreas, 2006).

El psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*, es originario de Taiwán (Halbert; Manjunath, 2004) y se reportó en Colombia por primera vez en el año 2007 (King et al., 2008). Actualmente, constituye una amenaza potencial para la citricultura mundial

(Halbert; Manjunath, 2004), se relaciona con su capacidad para transmitir las bacterias *Candidatus Liberibacter* var. *asiaticus*, *africanus* y *americanus*, agentes causales de la enfermedad llamada "Huanglongbing" (HLB) (Garnier et al., 2000; Halbert; Manjunath, 2004).

El manejo tradicional de *D. citri* en la mayoría de los países, donde esta presente el insecto, consiste en la aplicación continua de plaguicidas de amplio espectro, sin criterios técnicos en la mayoría de las veces. Este método es muy eficiente y simple de aplicar por los agricultores. Sin embargo, la utilización exagerada de los insecticidas puede alterar el equilibrio a las poblaciones de los insectos benéficos y generar resistencia a los insectos plaga (Hernández-Fuentes et al., 2012).

Por lo anterior, el control biológico se considera como otra de las alternativa para el manejo de *D. citri* y relega sucesivamente el control químico a un papel como 'último muro de contención', cuando las otras medidas por sí solas o en combinación no son lo suficientemente efectivas (Serra; Andreas, 2006).

El control biológico, es un método considerado como promisorio para el control de insectos vectores como *D. citri*. Existe una gran diversidad de enemigos naturales que se alimentan de *D. citri*, tales como arácnidos, crisópidos, sírfidos y coccinélidos, destacándose este último grupo entre los depredadores más eficaces (Lozano Contreras; Jasso Argumedo, 2013). Por otra parte, los parasitoides ejercen una función primordial en la regulación de las poblaciones del psílido, señalando las especies asiáticas como *Tamarixia radiata*, Wasterston (Hymenoptera: Eulophidae) y *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae) entre las más efectivas (Halbert; Manjunath, 2004).

El control biológico clásico de *D. citri* es una importante herramienta para la regulación del psílido asiático de los cítricos y manejo de la enfermedad Huanglongbing. El parasitoide *T. radiata* es uno de los enemigos naturales de *D. citri* más estudiado, desde el punto de vista del control biológico clásico. Se caracteriza por desarrollarse como un ectoparasitoide idiobionte de ninfas, que parasita el tercero, cuarto, y quinto estadio ninfal (Graham, 1991). Este parasitoide ha sido introducido en muchas regiones para el control

biológico de *D. citri*, como Estados Unidos, Cuba, Brasil e incluyendo algunos países asiáticos (Ferreira et al., 2013).

En Colombia se reportó el parasitoide *T. radiata* en las zonas de Cundinamarca, Norte de Santander (Ebratt-Ravelo et al., 2011) y Valle del Cauca (Kondo et al., 2012). Actualmente CORPOICA viene adelantado programas enfocados en el desarrollo de protocolos para producción de *T. radiata* en las condiciones de Colombia.

El control biológico con el uso y/o aplicación de hongos entomopatógenos es otra de las alternativas utilizadas para el control de *D. citri*. A pesar de conocerse la existencia de hongos entomopatógenos que de forma específica atacan a insectos de varias especies, su aplicación práctica es aún reciente, se caracterizan por su selectividad, colonización, establecimiento y baja residualidad, que los hacen a estos microorganismos exitosos en el control de *D. citri* (Serra; Andreas, 2006).

La presente investigación hizo énfasis en el aislamiento, selección, identificación molecular y caracterización de la patogenicidad de los aislados de hongos entomopatógenos asociadas al psílido en los departamentos del Valle del Cauca y Quindío. Se considera entonces, como un inicio en investigaciones sobre el tema en particular y abre la puerta para generar espacios de indagación sobre temáticas relacionadas con la selección y comparación de la efectividad de las cepas de hongos entomopatógenos en regiones cítrícolas, uso de hongos entomopatógenos dentro del control biológico de *D. citri*.

El éxito en el manejo de plagas mediante el uso de hongos entomopatógenos depende en cierta medida de la identificación de las especies con exactitud. La identificación de entomopatógenos se realiza usualmente por morfología y características culturales, por lo que ha sido necesario el empleo de otros métodos rápidos, confiables y sensibles (identificación molecular), que con sus aplicaciones específicas y ventajas, permitan la diferenciación de entomopatógenos y puedan ser útiles en la implementación de medidas apropiadas de control biológico (Bull; Ward; Goodfellow, 2000).

Para la identificación molecular de hongos entomopatógenos se utilizó el análisis de la región ITS del ADNr, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) como la herramienta molecular más empleada para la caracterización e identificación de hongos entomopatógenos (Valadez-Moctezuma; Kahl, 2005). Este método de identificación de hongos es rápido, confiable y sensible, lo que permite la diferenciación de hongos entomopatógenos y su correcta implementación en programas de control biológico (Ayra et al., 2001).

### **1.2.1 Clasificación Taxonómica de *Diaphorina citri***

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Sub orden: *Sternorrhyncha*

Súper familia: *Psylloidea*

Familia: *Liviidae*

Género: *Diaphorina*

Especie: *Diaphorina citri* Kuwayama

Sinonimia: *Euphalerus citri* Kuwayama (Ortiz Reyes et al., 2014).

### **1.2.2 Biología de *Diaphorina citri***

Los huevos de *D. citri* son ovipositados por la hembra verticalmente en los ápices de los cogollos o en los primordios (Ortiz Reyes et al., 2014) y la oviposición está condicionada a la presencia de brotes. La fecundidad de las hembras depende del hospedero y la temperatura (Fernández; Miranda, 2005); por ejemplo en Colombia la fecundidad de las hembras fue de 23, 694 y 240 huevos por hembra a 17, 27 y 31°C, respectivamente (Ortiz Reyes et al., 2014). La duración de la incubación varía de 9,7 a 3,5 días a 15 y 28°C, respectivamente (Darderes, 2009). Las ninfas recién eclosionadas se alimentan de tejidos tiernos y presentan poca movilidad en los primeros estados de desarrollo (Yang, 1984). Estas se establecen sobre los brotes y los peciolos formando colonias con un número variable de individuos. Las ninfas excretan filamentos cerosos de color blanco a manera de hilos que salen del extremo abdominal (Halberth; Manjunath, 2004). Es

posible que se establezcan asociaciones con hormigas atraídas por estas secreciones como fuente de alimento (Ortiz Reyes et al., 2014).

Los adultos tienen poca capacidad para sostener vuelos muy largos, pero pueden ser transportados a grandes distancias por corrientes de aire (Darderes, 2009). La duración del ciclo de desarrollo de *D. citri* para Colombia varió de 14 a 30 días, a temperaturas entre 31 y 17°C; respectivamente, con humedad relativa 60 - 70% y fotoperiodo 14L: 10D (horas luz: oscuridad) (Ortiz Reyes et al., 2014). El rango óptimo de desarrollo para *D. citri* se encuentra entre 25 y 28°C. Por el contrario, en temperaturas inferiores a 10°C el ciclo de vida de *D. citri* se afecta en su desarrollo, supervivencia, longevidad y reproducción, por ser temperatura crítica inferior (Atwal; Chaudhary; Ramzan, 1970; Ortiz Reyes et al., 2014).

En Colombia actualmente *D. citri* se encuentra en la mayoría de los departamentos productores de cítricos, entre ellos: Antioquia, Atlántico, Bolívar, Boyaca, Caldas, Caqueta, Casanare, César, Córdoba, Cundinamarca, Huila, La Guajira, Magdalena, Meta, Nariño, Norte de Santander, Quindío, Risaralda, Santander, Sucre, Tolima y Valle del Cauca (ICA, 2014).

### **1.2.3 Características Morfológicas de *Diaphorina citri***

**Huevo** presentan una forma ovoide con una prolongación alargada hacia una de las puntas. Miden aproximadamente 0,30 mm de longitud y 0,14 mm de ancho. Recién ovipositados son de color amarillo claro, tornándose anaranjados próximos a eclosionar. Son ovipositados verticalmente en los ápices de los cogollos o en los primordios (Ortiz Reyes et al., 2014). Una hembra puede llegar a ovipositar más de 800 huevecillos. Tienen un periodo de incubación de 2 a 3 días a 27°C (Ortiz Reyes et al., 2014).

**Figura 1-1:** Huevos del psílido asiático de los cítricos *D. citri* Kuwayama



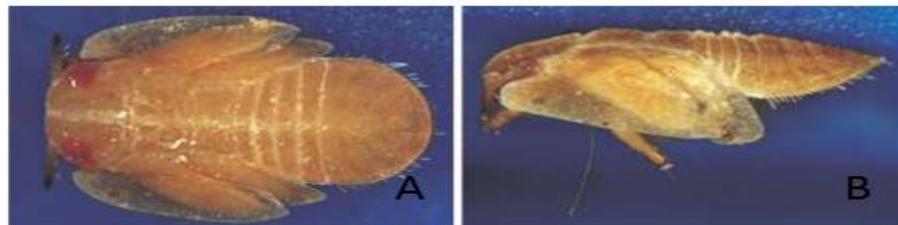
Fuente: (Mead, 2011). Foto: (Douglas L. Caldwell, Universidad de la Florida).

**Ninfa** son aplanadas dorso ventralmente, cuerpo de forma oval, cabeza y tórax fusionados, ojos compuestos de color rojo. Se caracterizan por presentar un color anaranjado-amarillo. Presenta setas a lo largo del abdomen, el número de filamentos varía de acuerdo al instar en el que se encuentre. Los promordios alares son conspicuos, especialmente en el quinto instar. Las ninfas se alimentan de tejidos tiernos y presentan poca movilidad en los primeros estados de desarrollo, el tamaño varía de acuerdo al instar y a la temperatura en la que se desarrollen (Yang, 1984).

**Figura 1-2:** Estados ninfales del psílido asiático de los cítricos *D. citri*.



1



2

Nota: 1. De izquierda a derecha Instar I, instar II, instar III, instar IV e instar V (David Hall, USDA). 2. Ninfa V instar de *D. citri*. A. cuerpo ovalado, se observan los primordios alares bien desarrollados, vista frontal. B. vista lateral. Cuerpo aplanado dorso ventralmente. Color generalmente amarillo a marrón. La longitud del cuerpo: 1,45-1,58 mm (Fuente: Ortiz Reyes et al., 2014).

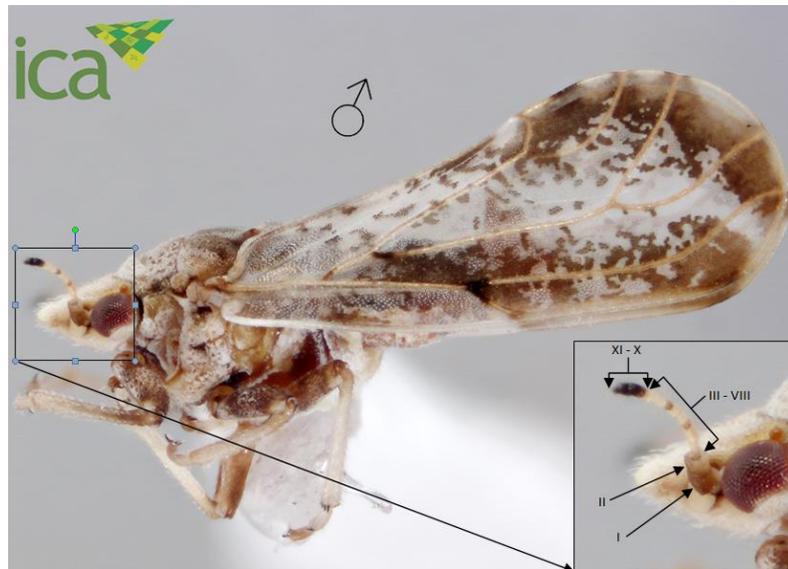
**Adulto.** Generalmente de color marrón. Cabeza ligeramente más estrecha que el tórax, la posición de los adultos durante el reposo es una característica, con la cabeza prácticamente pegada al sustrato y la punta del abdomen hacia arriba en un ángulo de 30° aproximadamente.

Antenas con los dos segmentos basales color marrón, segmentos 3ro a 8vo amarillentos con ápices de los segmentos 4to, 6to, 8vo y últimos dos segmentos negros, la longitud de la antena es de 0,48 mm (Figura 1-3). Ojos marrón oscuro. Pronoto con apariencia de caucho, redondeado y débilmente sinuoso anteriormente con dos foveas impresas sobre cada lado (Vargas, 2013).

El macho es levemente más pequeño que las hembras, la longitud del cuerpo del macho oscila entre 1,53–1,66 mm; mientras que la hembra oscila entre 1,90–2,06 mm. El segmento basal del edeago del macho es curvo, con el ápice del segmento apical dirigido dorsalmente. La hembra presenta una terminalia alargada y también hay

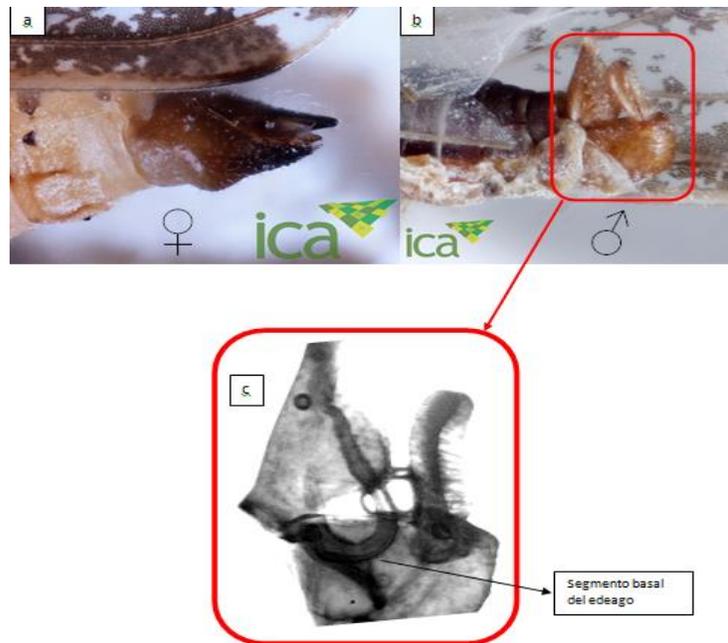
presencia de setas (Figura 1-4) (Vargas, 2013). Los adultos tienen poca capacidad para mantener vuelos muy largos cuando son perturbados saltan rápidamente (Darderes, 2009).

**Figura 1-3:** Habitus lateral del macho adulto de *D. citri*.



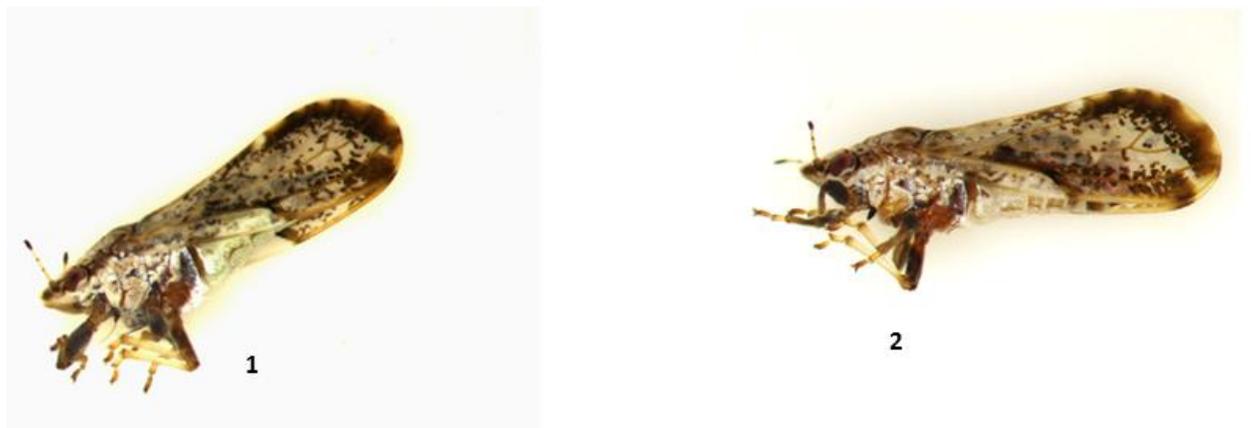
Nota: El recuadro muestra el detalle de coloración de la antena. Fuente:(ICA). Foto: (Vargas, 2013).

**Figura 1-4:** Estructura genital de *D. citri*.



Nota: a. vista lateral externa de la hembra, b. vista lateral externa del macho, c. vista lateral microscópica del macho con detalle de estructuras internas. Fuente: (ICA). Foto: (Vargas, 2013).

**Figura 1-5:** Adulto del psílido asiático de los cítricos *D. citri* Kuwayama.



Nota: 1. A la izquierda habito en vista lateral de la hembra. 2. A la derecha habito en vista lateral del macho (Ramos. 10x).

### **1.2.4 Distribución mundial de *Diaphorina citri***

El psílido *D. citri* se ha distribuido ampliamente por la cuenca del Caribe y es el vector de las especies *Candidatus Liberibacter asiaticus* (forma asiática) y *Candidatus Liberibacter americanus* (forma americana), causantes de HLB. Su distribución mundial es la siguiente:

**En Asia:** Andhra Pradesh, Arabia Saudita, Archipiélago Ryukyu, Arunachal Pradesh, Afghanistan, Assam, Bangladesh, Bihar, Burma, Camboya China, Delhi, Filipinas, Fujian, Guangdong, Guangxi, Gujarat, Haryana, Henan, Himachal Pradesh, Hong Kong, India, Indonesia, Irán, Jammu, Kashmir, Japón, Java, Karnataka, Kerala, Lakshadweep, Laos, Macao, Madhya Pradesh, Maharashtra, Malasia, Maldives, Maluku, Manipur, Meghalaya, Myanmar, Nepal, Nusa Tenggara, Pakistán, Punjab, Rajasthan, Sabah, Sikkim, Singapur, Sri Lanka, Sumatra, Taiwán, Tamil Nadu, Tailandia, Tripura, Uttar Pradesh, Vietnam, WestBengal, Yemen y Zhejiang (Darderes, 2009).

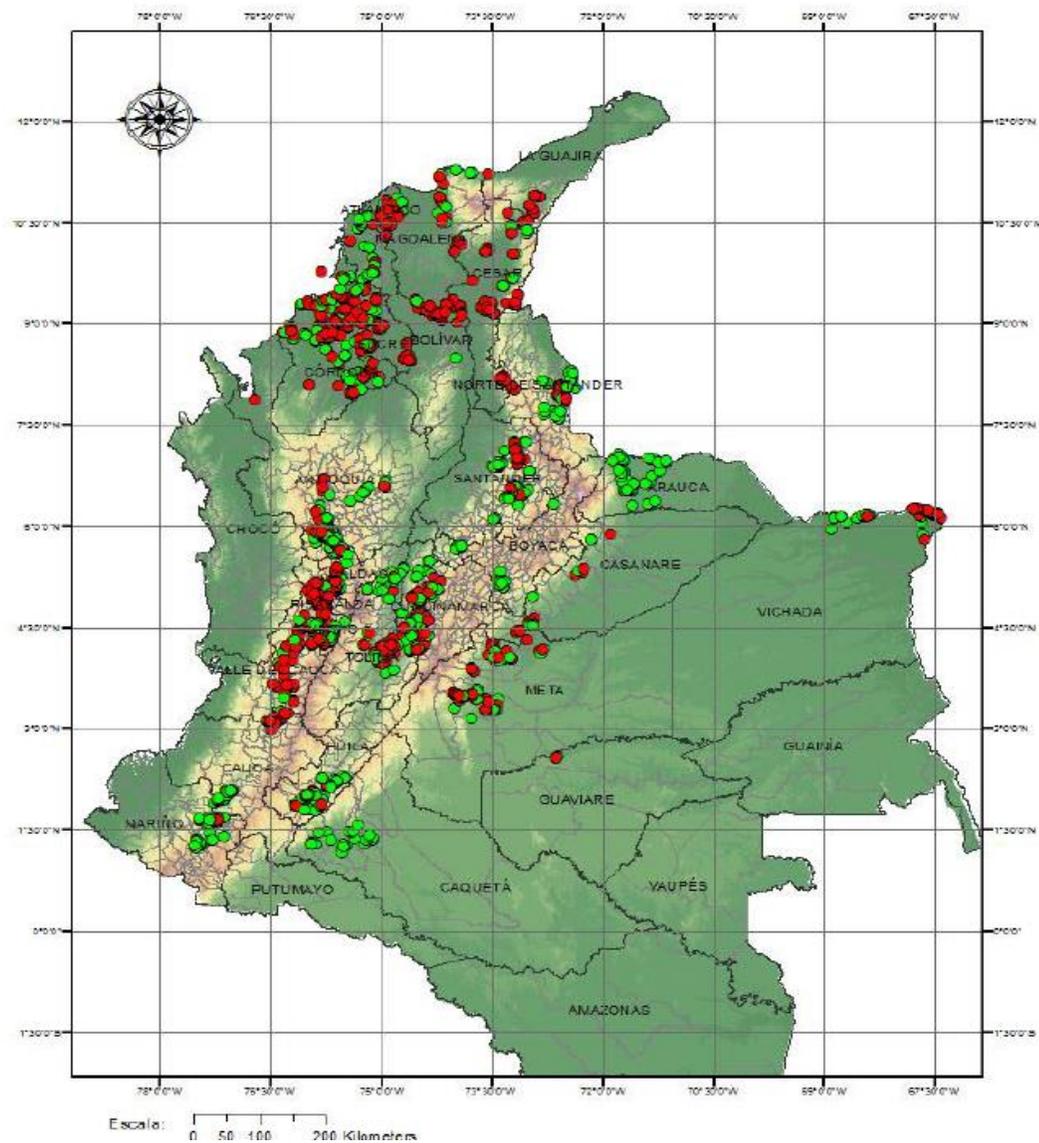
**En África:** Isla Mauricio e Isla Reunión

**En América** (incluye norte, centro y sur): Argentina, Bahamas, Belize, Bolivia, Brasil, Costa Rica, Cuba, El Salvador, Guadalupe, Guatemala, Hawaii, Honduras, Islas Caimán, Jamaica, México, Paraguay, Puerto Rico, República Dominicana, Uruguay, USA (Texas, Louisiana, Florida), Venezuela y Colombia (Darderes, 2009).

**En Colombia:** El ICA viene realizando muestreos de *D. citri*, desde marzo de 2012, hasta la fecha se han inspeccionado 11.042 sitios en 434 municipios localizados en 26 departamentos; se detectó la plaga en 3951 sitios equivalente al 35 % del total muestreado. El rastreo fue intensivo y se realizó en los departamentos de Antioquia, Arauca, Atlántico, Bolívar, Boyaca, Caldas, Caqueta, Casanare, Cauca, Cesar, Córdoba, Cundinamarca, Huila, La Guajira, Magdalena, Meta, Nariño, Norte de Santander, Quindío, Risaralda, San Andres y Providencia, Santander, Sucre, Tolima, Valle del Cauca y Vichada (Figura 1.6). La distribución actual de *D. citri* en el país se puede caracterizar como presente en toda el área sembrada con cultivos de cítricos (ICA, 2014).

Las muestras de los adultos de *D. citri* y tejido vegetal colectadas por el Instituto Colombiano Agropecuario, fueron enviadas al Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario y Molecular del ICA Tibaitatá para la identificación de la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp., mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR). Como resultado de estos análisis, se detectó la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* en insectos y tejido vegetal en los municipios de Distracción y Fonseca (Guajira) (ICA, 2016).

**Figura 1-6:** Distribución geográfica del psílido asiático del *D. citri* en Colombia.



### **1.2.5 Plantas hospederas de *Diaphorina citri***

Las plantas hospedantes de *D. citri* son exclusivamente de la familia Rutaceae, con más de 50 especies de plantas, entre ellas: *Atalantia missionis*, *Citrus* spp., *Citrus aurantifolia*, *Citrus aurantium*, *Citrus limon*, *Citrus medica*, *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis*, *Clausena anisum-olens*, *Fortunella* spp., *Murraya paniculata*, *Murraya exotica*, *Poncirus trifoliata*, *Swinglea glutinosa* (Aubert, 1987; Halbert; Manjunath, 2004).

El Mirto o Flor de azahar (*M. paniculata*), es considerado el hospedero ideal de *D. citri*, por su capacidad de producir más rápidamente un mayor número de brotes proporcionando un mayor lapso de tiempo en reproducción comparado con especies de cítricos cultivadas; *M. paniculata* es entonces la planta preferida por *D. citri* para alimentarse, ovipositar y desarrollarse en estado ninfal (Tsai; Liu, 2000).

### **1.2.6 Importancia económica de *Diaphorina citri***

El psílido asiático de los cítricos es una plaga importante a nivel mundial, debido a que es el vector de la enfermedad conocida como HLB, transmitida por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Actualmente la enfermedad es un problema grave en muchos países de Asia, África, en la península Arábiga, Brasil y Estados Unidos (Brlansky; Rogers, 2007; Jagoueix; Bove; Garnier, 1994).

Huanglongbing es considerada la enfermedad más devastadora para los cítricos a nivel mundial (Halbert; Manjunath, 2004; Bové, 2006; Miranda et al., 2008). Los árboles infectados por HLB en poco tiempo se vuelven decadentes e improductivos y finalmente mueren. En la actualidad, no se conoce tratamiento para esta enfermedad (Gottwald; Da Graça; Bassanezi, 2007). Se ha reportado que el HLB causó la muerte de más de 63 millones de árboles, principalmente en Asia, Sudáfrica y Brasil (Halbert; Manjunath, 2004; Bové, 2006).

Se reportan pérdidas anuales ocasionadas por el HLB en Sudáfrica del 30 al 100% de la producción, donde afecta todas las especies, sin importar el tipo de patrón (portainjerto). La producción de cítricos en Filipinas disminuyó de 11.700 a 100 toneladas entre 1960 y 1970 cuando siete millones de plantas se vieron afectadas durante esa década y por ello

la superficie citrícola se redujo en más de 60%. En la provincia de Guandong, China, durante el periodo 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 450 000 a 5.000 toneladas (Bové, 2006).

En Estados Unidos, Huanglongbing ha ocasionado pérdidas económicas significativas para la industria citrícola, puesto que disminuyó cerca del 25% la producción de cítricos entre los años 2005 y 2011. En el estado de la Florida la presencia del HLB incrementó en un 50% los costos de producción y ocasionó disminución de la producción en un 25% (León, 2015). En Indonesia y Arabia Saudita las plantaciones fueron abandonadas o desaparecieron por completo. En Brasil se erradicaron tres millones de árboles de naranja en el año 2004 a consecuencia de HLB (Bové, 2006).

### **1.2.7 Control químico de *Diaphorina citri***

El control químico de *D. citri* es la principal estrategia empleada por los agricultores para disminuir las poblaciones del insecto y reducir la incidencia de la enfermedad en los cultivos (Tiwari et al., 2011). Dentro de los grupos químicos de insecticidas utilizados para el control del psílido tenemos los organofosforados, piretroides y neonicotinoides.

Los neonicotinoides son el grupo más ampliamente utilizado en la citricultura, entre ellos el Imidacloprid, su aplicación inicia desde la etapa de viveros y continua en todas las fases de crecimiento de la planta (Yamamoto, 2008). Más allá de un efecto letal del imidacloprid se reportan efectos sobre la fecundidad, fertilidad, longevidad del psílido, así como la capacidad de alimentación del insecto (Boina et al., 2009). Sin embargo, debido al uso inadecuado de esta molécula se han reportado ciertos grados de resistencia por parte de *D. citri* lo que obliga a la búsqueda de estrategias de manejo diferentes (Maschio, 2011).

El imidacloprid se ha visto comprometido en eventos por envenenamiento directo o cambios en los niveles de la población y distribución de insectos como las abejas productoras de miel (*Apis mellifera*) en Europa, que se alimentaban de girasoles tratados con el neonicotinoide imidacloprid al sembrar las semillas. El mismo fundamento y los

continuos problemas con la mortalidad de las abejas y la producción de miel dieron como resultado la suspensión del mismo tratamiento en los cultivos de maíz, en el 2004. También se prohibió un tratamiento alternativo para las semillas (fipronil) de girasol al descubrir residuos de este producto en plantaciones de girasoles en floración (Devine et al., 2008).

Recientemente algunos estudios están evaluando el potencial de nuevos insecticidas como pymetrozine y reguladores de crecimiento (IRC) para el control de *D. citri*. Pymetrozine es un insecticida selectivo que se liga a los receptores neuronales promoviendo la liberación de serotonina en los espacios sináptico y una vez activados estos receptores promueven una inhibición nerviosa del aparato succionador del insecto. Pymetrozine es efectivo contra áfidos (Bedford et al., 1998) y mosca blanca (Polston; Sherwood, 2003).

Entre los IRCs, se destacan pyriproxyfen buprofezin y diflubenzuron. Piriproxyfen es un agonista de la hormona juvenil afectando todas las fases de desarrollo del insecto (Liu, 2003). Piriproxyfen afecta la fecundidad e inhibe la eclosión de ninfas, causa alta mortalidad de ninfas de *D. citri* en los primeros instares, siendo ninfas del V instar que alcanzando su fase adulta no consiguieron desprender su exuvia o presentaban deformaciones corporales (Boina et al., 2009; Tiwari et al., 2013).

Los insecticidas de contacto utilizados para el control de *D. citri* como dimetoato y malathion tienen un buen efecto para disminuir la densidad de población del insecto, con un control de más del 80% y una residualidad media de 30 días (Yamamoto; Miranda, 2009).

El control químico de *D. citri* es una de las estrategias más eficientes en la disminución de las poblaciones del psílido asiático; sin embargo, las aplicaciones de los insecticidas como Abamectin e Imidacloprid tienen efectos negativos sobre las poblaciones de *Tamarixia radiata* (Cocco; Hoy, 2008). Los mismos autores reportan que aspersiones de estos dos productos en la dosis más baja recomendada en la etiqueta, causaron una mortalidad de adultos de *T. radiata* superiores al 90% cuando el producto cayó directamente sobre el parasitoide.

### 1.2.8 Control biológico por parasitoides y depredadores

**Presencia de Parasitoides** La avispa *Tamarixia radiata*, Wasterston (Hymenoptera: Eulophidae) es el parasitoide más eficiente en el control de ninfas de *D. citri*.

*T. radiata* tiene un gran potencial para el control de *D. citri* ya sea por parasitoidismo o por depredación de las ninfas más jóvenes (Chien, 1995; Skelley; Hoy, 2004) y por qué además posee una alta capacidad reproductiva (Hoy; Nguyen; Jeyaprakash, 2004).

La longevidad de *T. radiata* oscila entre 18 y 26 días, la fecundidad específica (huevos/hembra/día) es mayor los primeros 9 días de ovoposición y el tiempo de fecundidad para las hembras es de 0,94 días. Las hembras de *T. radiata* presentan una tasa de crecimiento reproductivo (GRR) de 337,77 huevos/día y una tasa de ovoposición diaria de 11,26 huevos/hembra/día. Los valores como la tasa intrínseca de incremento ( $r_m$ ) y la tasa finita de crecimiento ( $l$ ) son de 0,31 y 1,02, respectivamente, los datos se obtuvieron bajo condiciones de 14 horas luz, 70%±10% humedad relativa y temperatura constante de 28°C±1°C (Baños; Miranda; Martinez, 2013).

La especie *T. radiata* posee la habilidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales por lo que su utilización en programas de control biológico de *D. citri* ha sido exitosa en algunas partes del mundo (Aubert; Bové; Etienne, 1980; Chien; Chiu; Ku, 1989; Étienne et al., 2001). Un ejemplo de su efectividad, es lo sucedido en Cuba, donde la *T. radiata* no se introdujo intencionalmente, pero logró reducir las poblaciones de *D. citri* de forma natural (González et al., 2005); en México, se observó que el 30% de las ninfas del psilido fueron parasitadas por *T. radiata*, en los meses de junio y julio de 2010 (Sánchez; Zamora; Arredondo, 2010).

En la Florida, para el control de *D. citri* se importaron dos parasitoides *T. radiata* y *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae) procedentes desde Taiwan y Vietnam en el año 1998 (Hoy; Nguyen; Jeyaprakash, 2004), con los cuales se implementó un programa de manejo integrado en varios estados de los Estados Unidos. En la actualidad *T. radiata* se ha establecido en la mayoría de las regiones cítricas de la Florida, mientras que *D. aligarhensis* no parece haberse establecido. Los resultados fueron favorables ya que el parasitismo de *D. citri* llegó hasta el 56% (Qureshi et al., 2009).

Ebratt-Ravelo et al., (2011) registraron a *T. radiata* por primera vez en Colombia como parasitoide de *D. citri*, basado en la presencia de ninfas de V instar parasitadas, colectadas en Cundinamarca y Norte de Santander; Kondo et al., (2012) también reportaron la presencia de *T. radiata* parasitando a *D. citri* en los municipios de Palmira, Sevilla y Zarzal, en el departamento del Valle del Cauca, Colombia.

**Presencia de depredadores** La densidad de enemigos naturales de *D. citri* en otros países de América, es baja, posiblemente porque *D. citri* es un insecto recientemente introducido. Sin embargo, se reportan como especies depredadoras de *D. citri*, insectos de la familia Coccinellidae como: *Chilorus* sp., *Hippodamia* sp., *Chilocorus cacti*, *Olla v-nigrum* y la especie *Chrysoperla* sp. (Neuroptera: Chrysopidae), alimentándose de huevos y ninfas (Cabrera et al., 2002; González et al., 2005).

### 1.2.9 Control biológico con hongos entomopatógenos

El control biológico con hongos entomopatógenos, es otra alternativa con que se cuenta para combatir el psílido asiático de los cítricos con buenos resultados, se destacan los hongos: *Hirsutella citriformis* (Speare), *Isaria fumosorosea* (Wize), *Beauveria bassiana* (Bals-Criv) Vuill y *Metarhizium brunneum* (Petch) (Sandoval-Rincón et al., 2010; Samson, 1974; Subandiyah et al., 2000; Xie; Su; Lin, 1988; Yang et al., 2006; Gandarilla-Pacheco et al., 2013).

Se ha reportado al hongo entomopatógeno *Hirsutella citriformis*, atacando adultos de *D. citri* en los países de Indonesia (Subandiyah et al., 2000), Isla Guadalupe (Étienne et al., 2001) y Cuba (Sandoval-Rincón et al., 2010).

En México y Estados Unidos se han identificado hongos entomopatógenos que atacan *D. citri*, como: *Hirsutella citriformis* (Hall et al., 2012), *Hirsutella* sp. (Meyer; Hoy; Boucias, 2007), *Isaria fumosorosea* (Wize) (= *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) (Samson, 1974; Subandiyah et al., 2000), *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas (*Lecanicillium lecanii*), *Beauveria bassiana* (Bals-Criv) Vuill (Xie; Su; Lin, 1988; Yang et al., 2006),

*Acrostalagmus aphidum* (Oudem) y *Paecilomyces javanicus* (Bally. AHS Brown y G. Smith) (Yang et al., 2006).

En la Isla Réunion, Aubert (1987) reporta los hongos entomopatógenos *Cladosporium sp. nr. oxysporum* (Berk. y M.A. Curtis), y *Capnodium citri* (Berk. y Desm), como factores importantes de mortalidad para ninfas de *D. citri*.

En la Florida, Meyer; Hoy; Boucias (2007) reportan mortalidad de adultos *D. citri* causada por el hongo *H. citriformis*, generalmente desde el verano hasta el invierno y en árboles de gran porte (Hall, 2008). Los mismos autores registran muertes de adultos, causadas por *Isaria fumosorosea*.

En Cuba, Álvarez; Naranjo; Grillo (1994) registran muerte de ninfas y adultos de *D. citri*, causadas por *H. citriformis* y *B. bassiana* y de adultos por *Paecilomyces spp.*, en poblaciones de insectos desarrolladas en *C. aurantifolia* y *M. paniculata*.

En Tuxpan, Veracruz, México, detectaron a *Hirsutella spp.*, infectando el 21.1% de adultos de *D. citri*, a 50 a 60% de humedad relativa (Cárdenas et al., 2008).

Conceschi (2013) destaca las investigaciones realizadas por Padulla; Alves (2009) en Brasil, sobre hongos entomopatógenos para el control de *D. citri*. Estos estudios han contribuido en la selección de cepas patogenicas para la elaboración de nuevos micoinsecticidas, creados a partir de los hongos *Beauveria bassiana* (Bals-Criv), *Hirsutella thompsonii* (Fisher), *Isaria farinosa* (Holms.), *Isaria fumosorosea* (Wize), *Lecanicillum longisporum* (Petch. Zare & W.gams), *Lecanicillum muscarium* (Petch. Zare y W. gams), *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin y *Syngliocladium spp.*

En Brasil, se evaluó la patogenicidad de los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Lecanicillum muscarum*, *L. longisporum*, *P. fumosoroseus*, *P. farinosus* y *Syngliocladium sp. (=Cordyceps varaibilis)* (Petch) en concentración de  $5 \times 10^7$  esporas, *H. thompsoni* en concentración de  $2,8 \times 10^7$  conidios/ml, sobre ninfas de II al IV instar (Padulla, 2007). Los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *H. thompsoni*, *L. muscarum* y *P. fumosorosus* fueron patogénicos a las ninfas del psílido. La cepa Esalq-PL63, *B. bassiana*, causó una mortalidad aproximada del 72% de las ninfas, a los siete días después de la inoculación;

con este hongo también se vio afectado el proceso de metamorfosis de las ninfas (Padulla, 2007).

Los hongos entomopatógenos pueden suprimir eficazmente las poblaciones de psílicos, especialmente durante los períodos de alta humedad relativa (Xie; Su; Lin, 1988; Rivero Aragón; Grillo Ravelo, 2000; Yang et al., 2006; Meyer; Hoy; Boucias, 2007). Sin embargo, son pocos los hongos entomopatógenos que se integran en los programas de manejo integrado del psílido asiático de los cítricos, principalmente debido a su adaptación limitada a factores ambientales como la baja humedad relativa y la temperatura (Padulla; Alves, 2009).

### **1.2.10 Clasificación Taxonómica de *Candidatus Liberibacter***

Dominio: Eubacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: Rhizobiales

Familia: Phyllobacteriaceae

Género: Liberibacter

Especie: *Candidatus Liberibacter asiaticus*

*Candidatus Liberibacter africanus* (Roskov et al., 2015)

**Caracterización:** *Candidatus Liberibacter* spp., causantes del Huanglongbing de los cítricos, son procariontes Gram-negativa, restringidas a los tubos cribosos del floema, con paredes celulares muy delgadas que les permiten pasar por los plasmodesmos (Jagoueix; Bové; Garnier, 1994). El género Liberibacter pertenece a la subdivisión alfa de la clase Proteobacterias (Jagoueix; Bové; Garnier, 1996; Teixeira et al., 2005). El nombre de “*Candidatus Liberibacter*” se deriva del término “*Candidatus*” propuesto por Murray y Schleifer en 1994, como estado taxonómico intermedio y así proporcionar posteriormente, una adecuada clasificación, teniendo en cuenta la base de genes que permita determinar el nivel de género y especie (Bové, 2006); por lo tanto, no pueden ser clasificadas y caracterizadas con las técnicas tradicionales. El nombre trivial de

“Liberobacter” (Jagoueix; Bové; Garnier, 1996), posteriormente fue reemplazado por *Liberibacter* (Garnier et al., 2000).

### 1.2.11 Especies asociadas al Huanglongbing

La detección de *Candidatus Liberibacter* se basa en la amplificación por PCR del gen ARNr 16S. Los miembros del género son patógenos de plantas en su mayoría transmitidas por un psílido (Jagoueix; Bové; Garnier, 1996; Brlansky; Rogers, 2007).

Se conocen siete especies de bacterias del género *Candidatus Liberibacter*: *Candidatus Liberibacter asiaticus* con origen en Asia, *Candidatus Liberibacter africanus* con origen en África, *Candidatus Liberibacter americanus* originaria de Brasil, *Candidatus Liberibacter caribbeanus* con origen en Colombia. Otras especies de *Candidatus Liberibacter europaeus*, nueva especie descrita en el 2010 atacando pera (*Pyrus communis*), *Candidatus Liberibacter psyllaourous* ataca solanáceas (Hansen et al., 2008), y *Candidatus Liberibacter solanacearum* que afecta al cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) (Jagoueix; Bové; Garnier, 1996; Liefting, et al., 2009).

La especie asiática *Candidatus Liberibacter asiaticus*, es la especie más tolerante al calor. La enfermedad puede ser transmitida a los árboles de cítricos en regiones con temperaturas que oscilan entre 32 y 35°C, pero no se han encontrado plantas infectadas en áreas con temperaturas mayores a 38°C (López et al., 2009).

*Candidatus Liberibacter africanus*, se encuentra distribuida en el este, centro y sur de África. (Garnier et al., 2000; Teixeira et al., 2005). La enfermedad es más severa en áreas frescas con temperaturas entre 20 a 25°C, y altitud de 600 m.s.n.m., la enfermedad es menos severa a menor altitud y prácticamente no se presentan en altitudes por debajo de los 200 m.s.n.m (Garnier et al., 2000; Teixeira et al., 2005).

*Candidatus Liberibacter americanus* solo se ha encontrado en Brasil. Es menos tolerante al calor, puede infectar a los cítricos en un rango aproximado de 24 a 30°C, pero nunca a temperaturas mayores (López et al., 2009). La variante americana se asemeja a la asiática en la expresión de agresividad de los síntomas; sin embargo, estudios realizados

en Brasil indican que puede ser intolerante al calor como la variante africana, pudiendo no causar síntomas (López et al., 2009). Esta situación puede estar pasando actualmente, ya que a pesar de haber sido *Candidatus Liberibacter americanus* la primera especie detectada en Sao Paulo en 2004, ahora la mayoría de árboles enfermos de esa región son diagnosticados con *Candidatus Liberibacter asiaticus* (López et al., 2009).

*Candidatus Liberibacter caribbeanus*, se encuentra distribuida en la zona norte de Colombia. La bacteria fue colectada en dos árboles de cítricos de traspatio en el departamento de Córdoba, asociada a plantas de naranja valencia (*C. sinensis*) y mirto (*M. paniculata*); recientemente se ha comprobado que esta bacteria no está asociada con HLB (ICA, 2014).

*Candidatus Liberibacter* spp., presentan una relación persistente con *D. citri*, se reproducen dentro del insecto y son capaces de transmitirse a otras generaciones aunque en bajas proporciones (Pelz-Stelinsky et al., 2010). La principal forma de dispersión de la bacteria causante de HLB es a través de dos vectores: *Diaphorina citri* para la especie asiática y *Trioza erytreae* (Del Guercio) para la especie africana (Garnier et al., 2000; Meyer; Hoy; Boucias, 2007; Hall, 2008).

### **1.2.12 Rango de hospedantes de *Candidatus Liberibacter***

El Huanglongbing es una enfermedad que se manifiesta en plantas de la familia Rutaceae. Afecta severamente a la naranja (*C. sinensis*), mandarina (*C. reticulata*), y tangelo (*C. deliciosa*), pero muchas otras especies muestran más o menos síntomas pronunciados de la enfermedad. Las afecciones son menores o inexistentes en naranja trifolita con sus híbridos, lima mexicana (*C. aurantifolia*), y pomelo (*C. paradisi*) (Halbert; Manjunath, 2004).

Otras especies en la que se ha encontrado HLB son: Limonaria (*M. paniculata*), Limón mexicano (*C. aurantiifolia* Swingle), naranjo agrio (*C. aurantium*), pomelo (*C. grandis*), limón (*C. limon*), cidro (*C. medica*), naranja dulce (*C. sinensis*), limón volkameriana (*C. volkameriana*) (Halbert; Manjunath, 2004).

### 1.2.13 Interacción bacteria – vector

En general la interacción entre el patógeno y el vector ha sido poco estudiada existiendo datos contradictorios en relación a la eficiencia de transmisión y período de latencia. Probablemente esto se debe a las diferencias entre especies de vectores y bacterias involucradas en el patosistema en distintas regiones de Asia y África (Capoor; Rao; Viswanath, 1974). A pesar de lo expuesto, se debe concluir que tanto las ninfas de IV y V estadio como los adultos pueden adquirir el patógeno al succionar el floema de una planta enferma, el tiempo mínimo requerido para la adquisición es de 15-30 minutos, mientras que el tiempo de la inoculación es inferior a 1h (Van-Vuuren; Da-Graca, 1977). Existe una considerable diferencia en los informes de períodos de inactividad (latencia), que varían desde 24 horas entre 8-12 días (Graca, 1991), hasta 21 días (Capoor; Rao; Viswanath, 1974).

C. *Liberibacter asiaticus*, aparentemente se multiplica en las ninfas, pero no en los adultos de *D. citri* (Inoue et al., 2009). La bacteria es persistente y/o se multiplica en el vector, y en consecuencia, después de adquirir el patógeno, los adultos permanecen infectivos durante toda su vida (Xu et al., 1988; Hung et al., 2004).

### 1.2.14 Síntomas de la enfermedad

Los síntomas descritos para Huanglongbing de los cítricos son: defoliación de los árboles, clorosis, reducción del tamaño de frutos, amarillamiento de venas y moteado del follaje (Ahmad et al., 2008). El síntoma más evidente de la enfermedad es la presencia de ramas terminales del árbol con apariencia clorótica (FUNDECITRUS, 2009).

En las hojas, se observa aclaramiento de nervaduras, fuertes moteados tanto en la haz como en el envés, manchas de formas irregulares, verdes-claras o amarillas, mezcladas con el verde normal sin una clara división entre ellas. En algunos casos se observa el engrosamiento de las nervaduras de las hojas, tomando un aspecto corchoso (Bové 2006). Las hojas jóvenes afectadas permanecen de tamaño pequeño con moteado y

amarillamiento, se observa brotes múltiples con hojas pequeñas, pálidas y moteadas creciendo en posición erecta, a este síntoma se le llama oreja de conejo”.

Se han observado otros síntomas como la reducción del número de frutos en el árbol infectado, caída prematura, reverdecimiento de la cáscara, inversión de color de maduración, producción de frutos asimétricos y con presencia de moteado (Bové, 2006; Brlansky; Dewdney; Rogers, 2010). Otro sintoma es la disminución en la cantidad de jugo y concentración de sólidos solubles y azúcares, generando un sabor amargo desagradable (INISAV, 1999).

Las semillas pueden ser abortadas o de tamaño muy reducido, semidesarrolladas y/o atrofiadas, adquiriendo una coloración oscura (Bové, 2006; Robles, 2008).

En general los síntomas varían de acuerdo al tipo de infección, la etapa de la enfermedad, condiciones de manejo de la planta, entre otros, y pueden ser confundidos o enmascarados con los síntomas de otras enfermedades o deficiencias nutricionales de zinc, hierro, manganeso, calcio, azufre, boro y magnesio (Bové, 2006; Brlansky; Rogers, 2007; FUNDECITRUS, 2009).

### **1.2.15 Manejo de la enfermedad**

Para el manejo de Huanglongbing es importante establecer un programa basado en reducir la cantidad de inóculo, controlar el vector y usar material vegetal libre de la enfermedad (Irey; Gas; Gottwald, 2006). Así mismo, inmediatamente después de la detección de Huanglongbing en los cultivos, se debe revisar toda la plantación para determinar el grado de infección y los árboles infectados deben ser eliminados. Costa; Concordia (2005) recomiendan la implementación de un programa agresivo en toda la plantación para controlar el psílido asiático de los cítricos. Adicionalmente se debe establecer un vivero moderno para producir plantas libres de la enfermedad en una localidad remota, usando material de propagación certificado como libre de la enfermedad (Berg, 1999). También se recomienda una estrecha vigilancia de la presencia, desarrollo de la enfermedad y sus vectores (INISAV, 1999; Halbert; Manjunath, 2004; Robles; Sánchez; Delgadillo, 2009).

En el estado de Sao Pablo, Brasil, existen medidas sanitarias para prevenir y controlar la presencia de enfermedades transmitidas por vectores como CVC (Clorosis Variegada de los Cítricos) o MSC (Muerte Súbita de los Cítricos); tales medidas contemplan: la producción obligatoria de plantas de vivero (desde almácigo) bajo invernaderos con malla anti pulgón, la erradicación de plantas enfermas, cultivo de una sola variedad de cítrico en el huerto, la reducción de operaciones de poda, la disminución de las poblaciones de insectos por medio del control químico, control biológico (depredadores, parasitoides y hongos entomopatógenos) y la eliminación de otras plantas hospedantes del vector (Berg, 1999; Costa; Concordia, 2005).

### **1.2.16 Hongos entomopatógenos**

Los hongos son microorganismos eucariontes, sin clorofila, pueden ser unicelulares o pluricelulares, son filamentosos y con paredes celulares compuestas básicamente de polisacáridos y proteínas. Entre los polisacáridos se destacan la quitina, el glucano y el galactomanano. Las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas (Pontón, 2008). Se reproducen sexual o asexualmente con o sin esporas (Agrios, 2005).

La reproducción asexual es la más frecuente, involucrando la formación de esporas microscópicas de paredes delgadas llamadas conidias, los cuales se desarrollan en los conidióforos y se diseminan por el viento, agua u otros agentes (Pelczar; Reid; Chan, 1981). El ciclo de vida de un hongo puede dividirse en dos fases: la fase de crecimiento, constituido por el micelio vegetativo, el cual es el más conveniente para un crecimiento rápido y colonización del ambiente, siendo por ello la fase más vulnerable (Bartnicki-García, 1983) y la fase de reposo o latencia.

Los hongos entomopatógenos a diferencia de las bacterias y virus entomopatógenos no requieren ser ingeridos para infectar a sus hospederos, ya que pueden infectar al estar en contacto directo con ellos, a través de la penetración de la espora al integumento y de infectar diferentes estados de desarrollo del insecto (Ferron, 1978).

Se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos, entre los géneros más importantes están *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Lecanicillium* (Monzón, 2001).

Los hongos del *Phylum* Ascomycota se caracterizan por formar ascosporas (esporas sexuales), y que a su vez, pueden o no estar contenidas en una estructura denominada ascocarpos (que puede ser: apotecio, cleistotecio y peritecio) (Rojas, 2011). Dentro del *Phylum* Ascomycota, el orden Hypocreales, contiene ocho familias, dentro de las cuales tres agrupan hongos entomopatógenos: Familia Cordycipitaceae, Clavipitaceae y Ophicordycipitaceae.

La familia Cordycipitaceae agrupa los generos de mayor importancia agrícola tales como: *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicillium* (Liu, et al., 2003; Humber, 2012); en la familia *Clavipitaceae* se encuentran los generos *Metarhizium*, *Nomureae*, *Aschersonia* y *Pochina* y la familia Ophicordycipitaceae con los géneros *Hirsutella* y *Syngliocladium* (= *Colletotrichum*) (Humber, 2012).

### 1.2.17 Modo de acción de los hongos entomopatógenos

El proceso del desarrollo de una enfermedad causada por hongos en el insecto puede ser realizado en las siguientes etapas (figura1-7) (Alves, 1998; Tanada; Kaya, 1993; Guarín, 2007):

- **Adherencia de la conidia a la cutícula del insecto.** El primer contacto entre el hongo entomopatógeno y el insecto sucede cuando la espora del primero es depositada en la superficie de este último. El proceso de adhesión ocurre en tres etapas sucesivas: adsorción de la espora a la superficie mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteica en el insecto, la adhesión o consolidación de la interfase entre la espora pregerminada y la epicutícula y finalmente, la germinación y desarrollo hasta la formación del apresorio para comenzar la fase de penetración (Tanada; Kaya, 1993; Pedrini; Crespo; Juarez, 2007).

La adhesión de los conidios depende de la presencia de enzimas (lipasas, proteasas, quitinasas y esterases) que se producen en la superficie de los conidios y que alteran la superficie del tegumento del insecto, favoreciendo la germinación y nutrición del hongo (Hajek; St. Leger, 1994).

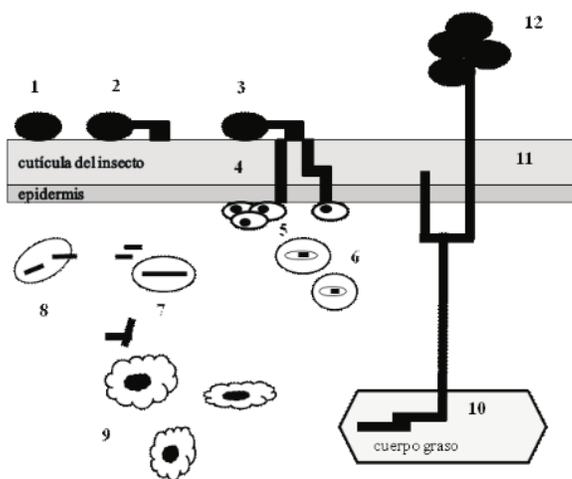
- **Germinación de la conidia en la cutícula del insecto.** La germinación ocurre dentro de un mínimo de 12 horas, siendo necesaria una humedad relativa alta (mayor al 90%). Fisiológicamente, la germinación de la conidia es el retorno de la actividad o metabolismo vegetativo (Bartnicki-García, 1983). Morfológicamente, la germinación es la emergencia de la célula vegetativa de una conidia, en forma de un tubo germinativo que crece sobre la superficie cuticular formándose un apresorio o penetrando directamente a la cutícula (Fargues, 1984; Bartnicki-García, 1983). La célula apresoria le permite adherirse a la superficie cuticular.
- **Penetración del hongo al hospedero.** La penetración se produce por un sistema enzimático de lipasas, proteasas y quitinasas liberadas al comienzo de la germinación de la espora (Roberts; Humber, 1981). Las enzimas tienen un efecto específico sobre cada uno de los componentes de la cutícula, así la epicutícula o capa más externa, formada por lípidos (ácidos grasos y parafina) es desintegrada por las lipasas; a su vez, la quitinasa desintegra la quitina, sustancia que confiere resistencia y dureza a la cutícula. Así mismo, las proteínas presentes en la cutícula son desintegradas por enzimas proteolíticas producidas por el hongo (Téllez-Jurado et al., 2009).
- **Colonización y producción de micelio en el hemocele.** El hongo crece en el hemocele como cuerpos hifales levaduriformes o blastosporas, que se multiplican por gemación (Roberts; Humber, 1981; Hajek; St. Leger, 1994).

En esta etapa, los hongos producen toxinas (destruccinas y citocalasina) que son las responsables de la muerte del hospedero que ocurre entre 48 horas o menos, mientras que la muerte es atribuida a la producción de toxinas (Roberts; Humber, 1981; Hajek; St. Leger 1994). Finalmente ocurre la muerte del insecto, esto

puede ser antecedido por cambios en el comportamiento del insecto, como contracciones y pérdida de coordinación (Roberts; Humber, 1981).

- **Extrusión con esporulación y dispersión de esporas.** Una vez que las hifas del hongo terminan su etapa de colonización y extrusión, perforando las partes intersegmentales del exoesqueleto con la emergencia del micelio hacia la superficie del hospedero y subsecuentemente la esporulación sobre el cuerpo del insecto y bajo condiciones favorables, los nuevos conidios producidos serán dispersados e infectarán a otros insectos (Vargas Flores, 2003; Restrepo Quiroz, 2015).

**Figura 1-7:** Esquema del desarrollo de un hongo entomopatógeno (modificado de Vilcinskis; Gotz, 1999).



1. Adhesión de la espora a la cutícula del insecto. 2. Germinación y formación de aprensorio. 3. Penetración de la cutícula. 4. Crecimiento lateral y penetración en la epidermis. 5. Agregación de los hemocitos en el lugar de penetración fúngica. 6. Fagocitosis de cuerpos hifales por células fagocíticas del insecto. 7. Transformación a cuerpos levaduriformes. 8. Evasión del sistema inmune. 9. Propagación en el hemocele. 10. Transformación a cuerpo hifal. 11. Extrusión, esporulación y germinación atravesando la cutícula del insecto. 12. Diseminación de esporas

### 1.2.18 Clasificación taxonómica: Género *Beauveria*

El Genero *Beauveria* pertenece al Phylum: Ascomycota; Clase: Hyphomycetes; Orden: Sordariomycetes; Familia: Cordycipitaceae; Género: *Beauveria* y especie: *B. bassiana* (Liu et al., 2003; Humber, 2012). El micelio de la fase asexual de las especies del género

*Beauveria* se caracteriza por ser blanco, posee conidióforos sencillos, irregularmente agrupados o en grupos verticilados, en algunas especies hinchados en la base y adelgazados hacia la región apical de la conidia (Carreño, 2003).

Morfológicamente, *B. bassiana* está conformada por hifas septadas de 2,5 a 25  $\mu\text{m}$  de diámetro, de donde se forman conidióforos simples raramente agrupados, con apariencia de jarrón (más ancho en el centro que en los extremos), los cuales sostienen los conidios, originados de formas impodial o acrópeta, dando una apariencia en zig zag al raquis (Barron, 2001).

Fue descrita por primera vez por Jean Beauverie en 1911 con el nombre de *Botrytis bassiana*. Un año más tarde, Vuillemin la clasificó en su clase actual (Benham; Miranda, 1953). Ensayos enzimáticos posteriores, determinaron el género como *Beauveria* sp. En la actualidad se registran 53 especies, entre las cuales se destacan: *B. alba*, *B. arenaria*, *B. brongniartii*, *B. brumptii*, *B. caledonica*, *B. velata*, *B. caledonica*, *B. densa*, *B. stephanoderis*, *B. vermiconia* y *B. sulfurescens* (Roskov et al., 2015). En los últimos años se han identificado nuevas especies del género *Beauveria* como *B. amorpha*, *B. asiática*, *B. sungii*, *B. varroae*, *B. australis*, *B. pseudobassiana*, *B. kipukae* y *B. lii* (Roskov et al., 2015).

Las esporas son esféricas y levemente ovaladas en medios aerobios, pero más ovaladas en medios anaerobios, llamadas blastósporas, sin embargo, indiferentemente de su morfología, presentan igual capacidad de infección. Tanto las esporas como las hifas, son hialinas, por lo que su apariencia es blancuzca para el ojo humano (Barron, 2001).

### **1.2.19 Clasificación taxonómica: Género *Metarhizium***

El género *Metarhizium* pertenece al Phylum: Ascomycota; Clase: Sordariomycetes; Orden: Hypocreales; Familia: Clavicipitaceae; Género: *Metarhizium* y Especie: *M. anisopliae* (Tanada y Kaya). El hongo *Metarhizium* se caracteriza por presentar hifas lisas y septadas, conidias predominantemente cilíndricas, agrupadas, hialinas, verde oliva, uninucleadas de extremos redondeados, el tamaño promedio es de 6,0  $\mu\text{m}$  de largo (Rango 5,2 - 7,1  $\mu\text{m}$ ) y de 2,2  $\mu\text{m}$  de ancho (rango 2,0 - 2,6  $\mu\text{m}$ ) (Humber, 2012).

Tulloch (1976) determinó que algunas especies no eran miembros del género y rechazó la mayor parte de los nombres publicados. Redujo el género a dos especies *M. anisopliae* y *M. flavoviride*, incluyendo el tipo y la otra variedad *M. anisopliae* var *anisopliae* y *M. anisopliae* var *majus*. Driver; Milner; Trueman (2000) después de un análisis filogenético de la región ITS (Espaciador Transcrito Interno) del ADN ribosomal, reconocieron ocho linajes como variedades y un grupo de especies no determinadas, es decir, *M. flavoviride* "Tipo E". Los mismos autores identifican y describen las variedades de ambos complejos de especies, incluidas cuatro variedades de *Metarhizium anisopliae*, como *M. anisopliae* var. *acridum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *lepidiotae* y *M. anisopliae* var. *majus*.

Actualmente para el género *Metarhizium* se reportan 22 especies y 16 taxones intraespecíficos; entre las especies se destacan: *M. anisopliae* f. *anisopliae*, *M. anisopliae* f. *majus*, *M. anisopliae* f. *minor*, *M. anisopliae* f. *oryctophagum*, *M. anisopliae* var. *acridum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *dcjhyiu*, *M. anisopliae* var. *frigidum*, *M. anisopliae* var. *lepidiotae* y *M. anisopliae* var. *majus* (Roskov et al., 2015).

*Metarhizium anisopliae*, es un hongo en el que predomina la reproducción asexual, exhibiendo diferentes grados de especificidad, la cual está influenciada por las características del patógeno y de la cutícula del hospedante (Humber, 2012). Ha sido reportado atacando a más de 200 especies de insectos, es conocido como "muscardina verde" (Padilla-Melo et al., 2000).

Durante la patogénesis, *M. anisopliae* tiene la capacidad de sintetizar enzimas extracelulares que pueden degradar polímeros de la cutícula (proteínas, lípidos y quitina), permitiendo el aprovechamiento de nutrientes para su crecimiento (Padilla-Melo et al., 2000) también produce destruxinas (Dtxs-depsipéptidos cíclicos), que representan factores importantes de virulencia que aceleran la muerte de los insectos (Liu; Tzeng, 2012). Dentro de esta familia de toxinas, las Dtxs A, B y E son altamente predominantes. La producción de toxinas de *M. anisopliae*, cepas V245 y V275, depende del sustrato disponible, siendo particularmente importante la cantidad de peptona y glucosa en el medio de cultivo (Wang et al., 2003).

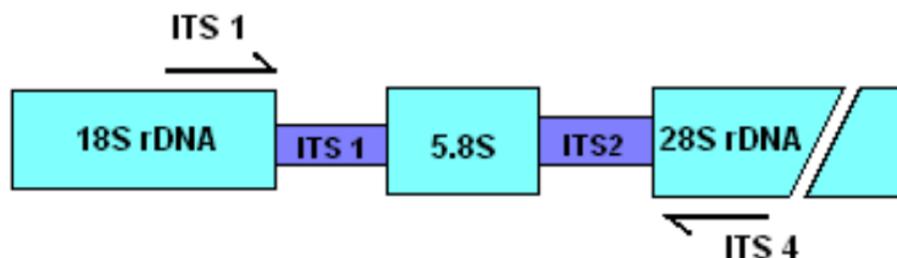
### 1.2.20 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

En 1983, Mullis desarrolló un procedimiento que permitía realizar copias de un fragmento de ADN de forma rápida y económica y que se denominó Reacción en Cadena de la Polimerasa (siglas en inglés PCR) (Mullis, 1990). Esta técnica supuso un gran avance para la universalización de las técnicas moleculares en los laboratorios de microbiología, por su sencillez y facilidad de aplicación. La PCR se basa en la repetición de tres procesos: (1) desnaturalización térmica del ADN; (2) hibridación de cebadores (oligonucleótidos) específicos al ADN de cadena sencilla, y (3) extensión enzimática del ADN. El proceso se lleva a cabo en un bloque térmico denominado termociclador. En cada repetición se duplica la cantidad de ADN específico, así en una reacción típica de 30–40 ciclos se generan 2<sup>30–40</sup> moléculas del ADN de interés (amplificaciones).

### 1.2.21 Regiones Espaciadoras Internas Transcritas (ITS)

Los genes ribosomales y los espacios entre ellos proveen sitios diana, atractivos para la detección molecular y estudios filogenéticos, porque en ellos ocurre un alto número de copias, poseen secuencias conservadas, como también, secuencias variables y pueden ser amplificados y secuenciados con iniciadores universales basados en sus secuencias conservadas. Los genes 5.8S, 18S y 28S (Figura 1-8) para el RNA ribosomal; en hongos son organizados normalmente en tándem con repeticiones idénticas de 60-200 copias por genoma haploide (Henson; French, 1993).

**Figura 1-8:** Diagrama de ubicación de las regiones ITS en el ribosoma.



Fuente (Ariza; Angel; Giraldo, 2003)

A pesar de la conservación de los genes del RNA de los hongos, existe la variación suficiente en las secuencias para permitir su uso como sitios diana para la amplificación diferencial. Considerablemente, la variación de secuencia más grande es encontrada en los espacios internos transcritos (ITS), regiones entre los genes rARN dentro de una unidad repetitiva de rARN. Entonces, algún organismo o incluso cepas diferentes aisladas de un mismo organismo que tengan repeticiones del rADN, pueden ser detectados específicamente por la selección de iniciadores basados en los espaciadores de las regiones variables (White et al., 1990; Henson; French, 1993).

Las regiones ITS son secuencias de ADN altamente específicas, que se encuentran entre los genes que codifican para el RNA ribosomal. Estas regiones son utilizadas en el estudio de poblaciones puesto que muestran diferencias evolutivas y permiten obtener una buena información filogenética y taxonómica de los individuos (Liu; Sinclair, 1992).

Las regiones ITS son de evolución rápida y por consiguiente su variabilidad permite la realización de análisis filogénicos, evolutivos y biogeográficos entre órdenes, géneros y especies relacionados, siendo de gran utilidad en casos en los cuales los caracteres morfológicos no son suficientes para la solución de problemas evolutivos y taxonómicos (Baldwin et al., 1995).

Actualmente, se cuenta con gran cantidad de secuencias de ADN ribosomal (rDNA) que han sido alineadas y comparadas en numerosos organismos, lo que ha permitido recolectar información acerca de sus relaciones filogenéticas. En especial los Espaciadores de Trascricción Interna (ITS) han sido ampliamente utilizados en el estudio de la relación filogenética entre taxones muy cercanos y en la identificación específica de organismos, especialmente hongos entomopatógenos.

### **1.2.22 Genes que codifican el ARN ribosomal**

Las secuencias que codifican el ARN ribosomal (ADNr) se han utilizado para el estudio de las relaciones filogenéticas y taxonómicas en hongos (Bruns et al., 1992). Los genes ribosomales contienen numerosas regiones con secuencias altamente conservadas y otras con gran variabilidad (White et al., 1990). El ADNr nuclear usualmente existe en los

hongos como elemento en bloques repetidos. Cada unidad está formada por un sistema complejo de secuencias que incluye los genes 18S, 28S y 5.8S, que codifican para las proteínas que forman las subunidades ribosomales y se encuentran separados por dos espaciadores internos que se transcriben, llamados ITS1 e ITS2, de una longitud entre 200 y 400 pares de bases (pb). Hay además un espaciador interno que no se transcribe, llamado IGS. Los módulos repetidos del ADNr nuclear pueden encontrarse en uno o varios cromosomas y el número varía de acuerdo con el genoma. Pueden encontrarse desde 60 copias en el género *Coprinus* hasta 200 en *Neurospora* (Iturralde; Ballester; Ramón, 2002).

Las secuencias 28S, 18S y 5.8S están altamente conservadas y evolucionan lentamente, por lo que se utilizan para obtener información sobre las relaciones filogenéticas. Las zonas no codificantes (ITS1, ITS2 e IGS) son más variables porque acumulan mayor número de mutaciones y tienen gran interés en la identificación y tipificación de especies fúngicas. De acuerdo a lo anterior, White et al., (1990) describieron y diseñaron cebadores específicos para amplificar y secuenciar varios segmentos del ADNr mitocondrial y nuclear de hongos, lo que abrió la posibilidad de realizar estudios filogenéticos con el uso de estos genes. La diversidad intraespecífica en el ADNr nuclear es común en hongos.

En estudios de polimorfismo en esta región para varias especies fúngicas han mostrado que el ADNr nuclear es adecuado para el análisis de la relación genética a nivel de género y especie (Kistler et al., 1987; Klassen; McNabb; Dick, 1987; Liu; Boucias; McCoy, 1995).



## 2. Identificación de aislados y caracterización de la patogenicidad

### 2.1 Metodología

#### 2.1.1 Localización.

Los muestreos para el desarrollo del presente trabajo se realizaron en los departamentos de Quindío y Valle del Cauca (Colombia), en altitudes promedio de 1260 y 1190 msmm, respectivamente; los cuales, actualmente son considerados como los principales productores de cítricos en Colombia, con una área de producción de 4,492 y 5,340 ha, respectivamente, y con rendimientos aproximados a 25 ton/ha (MINAGRICULTURA, 2012). Los aislamientos y pruebas de patogenicidad fueron realizados en la ciudad de Palmira.

#### 2.1.2 Muestreo de *D. citri*.

**Muestreo en el departamento del Valle del Cauca:** Los predios (área muestreada dentro de una finca) se encontraban ubicados en los municipios de Alcalá, Caicedonia, Sevilla, La Victoria, Roldanillo, La Unión, Bugalagrande y Tuluá ubicados entre 950 y 1350 m.s.n.m. y con temperaturas promedio entre 20 y 25°C. Las especies vegetales muestreadas fueron: *Citrus reticulata* Blanco, Mandarina Oneco y Arrayana, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, Naranja Valencia, Orange Sweet; *Citrus aurantifolia* (L.), limón pajarito y en la especie ornamental Mirto, *Murraya paniculata* (L.) Jack (Anexo B y C).

**Muestreo en el departamento del Quindío:** Se llevó a cabo en los municipios de Armenia, Buenavista, Quimbaya, Montenegro, La Tebaida y Calarcá, ubicados entre 1100 y 1350 m.s.n.m. y con temperaturas promedio entre 18 y 22°C. Las especies

vegetales muestreadas fueron: *Citrus reticulata* Blanco, Mandarina Oneco y Arrayana, *Citrus sinensis* (L.), Naranja Valencia, Hamlin, Orange Sweet; *Citrus latifolia* Tanaka, lima Tahití (Anexo A).

El muestreo consistió en seleccionar diez arboles en cada uno de los predios (áreas sembradas con una determinada especie de cítricos que osciló entre 1 a 3 ha), en cada árbol se seleccionaron cuatro ramas, una en cada punto cardinal, en cada rama se revisaron tanto hojas como brotes en busca de adultos del psílido muertos. (Figura 2-1) (Ebratt-Ravelo et al., 2011).

**Figura 2-1:** Muestreo de adultos micosados en árboles de cítricos.



### **2.1.3 Colecta de insectos muertos de *D. citri*.**

Se buscaron y colectaron individuos adultos muertos de *D. citri*, aparentemente con síntomas de infección por hongos entomopatógenos (Figura 2-2), tanto en brotes como en hojas del primer tercio de los árboles de cítricos y en plantas de jardín como *M. paniculata* conocido en Colombia como Mirto o Flor de azar.

Los insectos se introdujeron junto con las hojas y se empacaron individualmente en bolsas de plástico. Las muestras colectadas se llevaron al Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario del ICA, ubicado en el municipio de Palmira, Valle del Cauca, Colombia.

Todas las muestras fueron rotuladas con la siguiente información: georreferenciación del predio, nombre del municipio, nombre de la vereda, nombre de la finca, tipo de producción, nombre del propietario, tipo de cultivo, edad de la plantación, estado fenológico, nombre del colector, número de psíidos adultos vivos y muertos.

**Figura 2-2:** Características de los adultos aparentemente micosados colectados en campo.



1. Adulto de *Diaphorina citri* aparentemente esporulado. 2 y 3 Adultos con prolongaciones hifales externas. Imagen: Ramos 2014 (10x).

#### **2.1.4 Aislamiento de hongos a partir de adultos muertos de *D. citri*.**

Para el aislamiento de los hongos a partir de individuos sospechosos de micosis se realizó siembra directa del insecto muerto o parte de él, en medio PDAY (Papa Dextrosa Agar, enriquecido con extracto de levadura); los adultos muertos de *D. citri* colectados en campo se desprendieron cuidadosamente de las hojas donde se encontraban adheridos y se depositaron sobre papel filtro estéril. Se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1%/1min, se lavaron dos veces con agua destilada estéril para retirar el exceso de

hipoclorito de sodio, se secaron en una toalla de papel estéril y se sembraron en cajas Petri con medio PDAY, luego se mantuvieron a una temperatura de 26°C, hasta observar micelio (SENASICA-SAGARPA, 2013). Cuando se observó micelio, este se transfirió de manera directa a las cajas Petri, con la ayuda de un asa y bajo condiciones de aséptica. Posteriormente se incubó a 26°C, durante 25 a 30 días.

Otra metodología utilizada fue la del macerado de los insectos; para lo cual se desinfectó el insecto con hipoclorito de sodio al 0,05% durante un minuto, posteriormente se lavó dos veces con agua con el fin de retirar el exceso de hipoclorito de sodio. Se maceró el insecto en tubo para microcentrifuga Eppendorf con 1 mL de agua destilada esteril, luego se homogeneizó la muestra mediante la agitación manual durante un minuto. Se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$  y de la última dilución se extrajeron alícuotas de 100µL, las cuales fueron esparcidas con la ayuda de un asa Digiralsky estéril en medio PDA acidificado, se incubaron a una temperatura de 26°C, hasta observar colonias. Las colonias seleccionadas fueron sembradas en cajas Petri conteniendo medio PDA + Peptona a 26°C /25 a 30 días (Lacey, 1997).

Las cajas Petri se marcaron con el código asignado CV (cepa colectada en el Valle del Cauca) y CQ (cepa colectada en Quindío), seguido con el nombre de la finca donde se recolectaron y el número correspondiente de muestra con un dígito.

### **2.1.5 Elaboración de cultivos monospóricos**

La obtención de cultivos monospóricos a partir de aislamiento de hongos de adultos muertos de *D. citri* colectados en campo, se realizó mediante el método por agotamiento en placa (Rhodes; Smith; Faull, 1992). Una vez los aislamientos estaban esporulados, con la ayuda de una asa micológica estéril, se tomó una pequeña cantidad de inóculo y sobre una caja Petri que contenía medio PDA más Peptona, se procedió a hacer un estriado por agotamiento sobre toda la superficie de la caja Petri, con el fin de obtener colonias aisladas. Inicialmente se realizó el estriado del inóculo en la parte central de la caja Petri, luego se procedió a llenar completamente los espacios dentro de la caja. Al día siguiente bajo microscopio se observó el final del estriado en cada la caja Petri, con el fin de encontrar esporas solitarias germinadas y con una microaguja estéril se cortó un cuadro que contenía la espora. Éste se sembró en medio PDA + Peptona.

### 2.1.6 Selección de hongos entomopatógenos

Los aislamientos de hongos obtenidos por el método de siembra directa, se sometieron a una prueba de patogenicidad con el fin de determinar cuáles de las cepas tenían la capacidad de parasitar adultos de *D. citri*. Para ello se evaluó el porcentaje de mortalidad, previo al análisis morfológico y molecular.

Para la prueba de patogenicidad se seleccionaron adultos de *D. citri*, se sumergieron en una suspensión de esporas con una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/ml, durante un minuto. Con la ayuda de un pincel esterilizado se colocó un insecto dentro de un recipiente, el cual contenía un disco de papel filtro previamente humedecido. Los recipientes en su interior contenían brotes tiernos de plantas de mirto, previamente desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 1%. Los brotes se cambiaron cada dos días con el fin de proveer alimento fresco al insecto. Se evaluó la mortalidad causada por los hongos durante 10 días, observando bajo estereoscopio los síntomas y signos del patógeno. Para las siguientes pruebas de patogenicidad de esta investigación, la metodología anterior fue modificada por la propuesta de Padulla; Alves (2009).

### 2.1.7 Caracterización e Identificación morfológica

Los hongos entomopatógenos seleccionados después de la prueba de patogenicidad se caracterizaron morfológicamente. Se evaluó su crecimiento, coloración, apariencia y pigmentación del medio. La identificación morfológica se realizó mediante la técnica de microcultivo. Para realizar los microcultivos se tomaron las conidias individuales germinadas, las cuales se transfirieron en condiciones asépticas, a seis cajas Petri que contenían agar papa dextrosa (PDA), con una profundidad del medio 5mm y  $1 \text{ cm}^2$  de área de crecimiento, la capa de agar se colocó sobre láminas portaobjetos y después de inoculadas fueron cubiertas con laminillas, con el fin de mantener un buen nivel de humedad relativa, se le adicionó a un algodón estéril cuatro gotas de agua glicerizada al 10%; posteriormente se sellaron las cajas Petri y se incubaron a  $29^\circ\text{C}$ , se realizaron varias observaciones hasta encontrar las estructuras características del género de los hongos (Barnett; Hunter, 1987; Alexopoulos; Mins 1979; Castaño-Zapata, 1994).

### **2.1.8 Identificación molecular de los hongos entomopatógenos: Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó a partir de micelio fresco proveniente de los cultivos monospóricos, para lo cual se retiró aproximadamente 200 mg de micelio empleando una espátula estéril, la muestra se maceró adicionándole nitrógeno líquido para provocar la lisis de las células (Marmolejo et al., 2008).

Para la extracción del ADN genómico se empleó el KIT de extracción DNeasy® Plant-QIAGEN (plant mini kit de QUIAGEN), siguiendo las especificaciones descritas por el fabricante. El DNA obtenido se conservó a -20°C hasta el momento de su visualización.

Cada uno de las alícuotas de DNA total fue visualizado en un gel de agarosa al 0.8%, las muestras fueron separadas por electroforesis en tampón TBE 0.5X (Tris-borato 0.045M; EDTA 0.001M) a 80 voltios durante 40 minutos. El gel fue teñido en bromuro de etidio 0.5 µg/mL como se describe en (Sambrook; Macallum; Russel, 2001). La concentración de ADN se estimó por observación directa de la fluorescencia emitida y por comparación a partir de un marcador de 100 pb (Thermo Scientific GeneRuler).

### **2.1.9 Amplificaciones mediante PCR**

Para la identificación de los aislamientos fúngicos se emplearon los cebadores universales ITS1 e ITS4 (5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3' y 5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3') descritos por (White, et al., 1990). Para la PCR, se elaboró un cóctel con un volumen final de 50µl. Que contenía 0,2 mM de cada cebador (ITS1 e ITS4), 20 mM de Tris - HCl, 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1U Taq ADN polimerasa (Invitrogen) y 50 ng de DNA genómico (Becerra et al., 2007).

Las muestras fueron amplificadas utilizando un termociclador PT100 (MJ-Research, Watertown, MA) y los ciclos de amplificación consistieron en un ciclo de desnaturalización de 15 segundos a 94°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 50°C, 30 segundos de extensión a 72°C y un ciclo final de extensión de 7 minutos a 72°C. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa a 1.2 % en buffer TBE 1x y teñido con Bromuro

de etidio 0.5 ug/mL y registrada la imagen mediante un trasiluminador (Gel Logic 440).

Las reacciones de PCR se limpiaron de todos los excesos de reactivos, mediante el kit comercial recomendado por el fabricante (QIAquick PCR Purificación). Finalmente los productos de PCR limpios se enviaron a la compañía MACROGEN (Korea) para su secuenciación. La edición de las secuencias se realizó en cada uno de sus extremos empleando el programa Geneious ®. El alineamiento de las secuencias hermanas (“F” y “R”) se realizó en el programa Bioedit 7.1 en el cual fue generada la secuencia consenso. La identificación se realizó teniendo en cuenta la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Altschul et al., 1997)

Para el análisis filogenético y elaboración de los dendrogramas, se tomaron secuencias de referencia seleccionadas de la base de datos NCBI. Para *B. bassiana* se seleccionaron las secuencias de CENICAFE: AY 334535, AY 334536, AY 334537, AY 334538, AY 334539, AY 334540 AY 334541, AY 334542, AY 334543 y AY 334544, aisladas de adultos de Broca del café (*Hypotenemus hampei*) y que posiblemente son las precursoras de los productos comerciales, que nos permiten evaluar la afinidad de las cepas aisladas en este estudio (Cruz; Gaitán; Góngora, 2006); las secuencia reportadas por Ruan et al., (2010) obtenidas de adultos de *D. citri* en la provincia de Fujian, China: FJAT9620, FJAT 9719, FJAT 9621, FJAT9622, FJAT9624 y FJAT 9623 y las secuencias de los hongos *B. brogniati* HHWG1 y HH56, *B. asiatica* ARSEF 4474, *B. amorfa* ARSEF 2641, *B. vermiconia* ARSEF 2922, *B. caledonia* ARSEF 2251 y ARSEF 4302, *B. malaweinsis* ARSEF7760, *B. sungii* ARSEF 7281 y *B. cylyndrospora* FJ 973058, las cuales fueron comparadas con las secuencias anteriores, y sirven para nuestro estudio como referencia de grupo (Altschul et al., 1997).

Para el hongo *M. anisopliae*, se seleccionaron las secuencias HQ 722915, HQ 722914, FJ 971611, KP 067239, y KJ 543524 reportadas en la base de datos de NCBI para Colombia las cuales fueron reportadas de aislamientos de insectos plaga de palma de aceite y algunos trabajos de diversidad marina y microbiana; las secuencias FJ 545317, FJ 589647, FJ 589650, CG 423, CG 343 y CG97 son secuencia que presentan una homología superior al 99% a las encontradas en nuestro estudio, las cuales nos sirven de referencia para determinar la variabilidad genética del hongo y las secuencias de *M.*

*globosum* HQ 331459, *M. frigidum* HM055458, *M. cylyndrosporum* MY 00521, *M. cylyndrosporum* MY 00522, *M. cylyndrosporum* MY 00524 y *M. acridum* CG 423, como referencia de género para nuestro estudio. Las secuencias fueron tomadas de la base de datos NCBI (Altschul et al., 1997).

Las secuencias obtenidas se alinearon en el programa Mega 6.0 (Tamura et al., 2013), empleando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Tamura - Nei (Tamura; Nei, 1993) con un modelo de 1000 Bootstrap.

### **2.1.10 Re-aislamiento y conservación de los hongos entomopatógenos**

El re-aislamiento se hizo a partir de los cadáveres de insectos con micosis, en agar PDA modificado (ácido láctico 1% del volumen a preparar y peptona 5g/L), el cual se incubó a 26°C durante 7 días, para luego conservarse (Gidin, Glazer, Mishoutchenko, 2009).

La conservación de los hongos se realizó mediante la técnica de papel filtro (Aricapa; Correa, 1994). A partir de un cultivo de hongos entomopatógenos, de aproximadamente 8-10 días, se realizó un raspado de esporas con las cuales se obtuvo una suspensión de conidias en 5 ml de solución salina 0,85%. Con esta suspensión se impregno una caja Petri que contenía PDA + Peptona cubierto con fragmentos de papel filtro de aproximadamente 1x1 cm. Posteriormente, este cultivo se incubó a 26°C durante 8 días. Transcurrido este tiempo, se retiraron los fragmentos y se dejaron secar en una caja Petri estéril a la misma temperatura de incubación (26°C) por siete días, para finalmente conservarlos y almacenarlos dentro de sobre de papel glicin a -20°C.

### **2.1.11 Cría de adultos de *Diaphorina citri***

### **2.1.12 Multiplicación de plantas de Mirto (*Murraya paniculata*)**

Para obtener semillas se colectaron los frutos de coloración rojo intenso, se despulparon por medio de fricción, la semilla se secó bajo sombra por dos días y se sembró en bolsas de polietileno negras de calibre 9 x 2, que contenían un sustrato compuesto por tierra,

gallinaza y vinaza en proporción de 2:1:1. Las plántulas se mantuvieron bajo condiciones de sombra y riego diario en las primeras etapas. La primera poda se realizó cuando la planta tenía aproximadamente cuatro meses. Se eliminaron los brotes tiernos apicales dejando la planta a una altura de 40 cm con el fin de estimular la emisión de nuevos brotes (SENASICA, 2010).

Se realizaron actividades de riego, fertilización, control de malezas y control de plagas. El riego se realizó diariamente, con una regadera de mano, desde la siembra hasta la emergencia de la plántula, posteriormente, se hizo cada 3 días. La fertilización edáfica se realizó mensualmente, iniciando un mes después de la siembra. Se aplicó abono compuesto (NPK) 10-30-10 en dosis de 10 g/planta. La fertilización foliar se realizó con el producto comercial “todo en uno ®” a los dos meses después de la siembra en dosis de 5 cc/L.

El control de plagas se efectuó en la etapa de vivero. Para insectos como pulgones y hormigas se realizó hasta dos meses de germinada la planta y se suspendió un mes antes de trasladar la planta de mirto (*M. paniculata*) a las cajas de infestación, aproximadamente, a los cuatro meses. Después de esto, no se realizó ningún tipo de control para insectos.

Las plantas de *M. paniculata*, óptimas para ser infestadas con *D. citri*, fueron aquellas que tuvieron entre 6 a 10 brotes de 10 cm aproximadamente, sin síntomas de daño ni enfermedades. Las plantas seleccionadas se llevaron a las cajas de infestación. Cada caja de infestación consistió en un cubo de madera de 70 x 70 x 70 cm, con las paredes forradas con malla antitrips, provista de una puerta frontal que permite la entrada y salida de las plantas y con una base sólida para que soporte el peso de las plantas. Estas fueron trasladadas posteriormente a cajas de 60 x 60 x 90 cm, para permitir el crecimiento de las plantas.

En cada caja se introdujeron de 6 a 9 plantas de mirto y se procedió a infestarlas con 100 adultos de *D. citri*, provenientes de cercos vivos de *M. paniculata*, capturados con la ayuda de un aspirador entomológico. Previamente se verificó la identidad del insecto con ayuda de un estereoscopio. Las plantas permanecieron en contacto con los adultos de *D.*

*citri* durante siete días, tiempo suficiente para asegurar la ovoposición sobre los brotes de la planta.

Antes de sacar las plantas con los brotes infestados, se sacudió la planta para que los adultos volaran hacia las paredes de la jaula, quedando únicamente huevos y algunas ninfas de los primeros instares sobre la planta. Luego se trasladaron a otra caja de (60 x 60 x 90 cm) para que continuaran su desarrollo. El procedimiento se repitió hasta obtener la generación F2. Este procedimiento se hizo con el fin de utilizar insectos libres de patógenos en las pruebas de patogenicidad. Para las pruebas de patogenicidad se utilizaron ninfas de la generación F3 y adultos de la generación F2.

### **2.1.13 Prueba de patogenicidad de los hongos entomopatógenos en ninfas y adultos de *Diaphorina citri* en condiciones de laboratorio.**

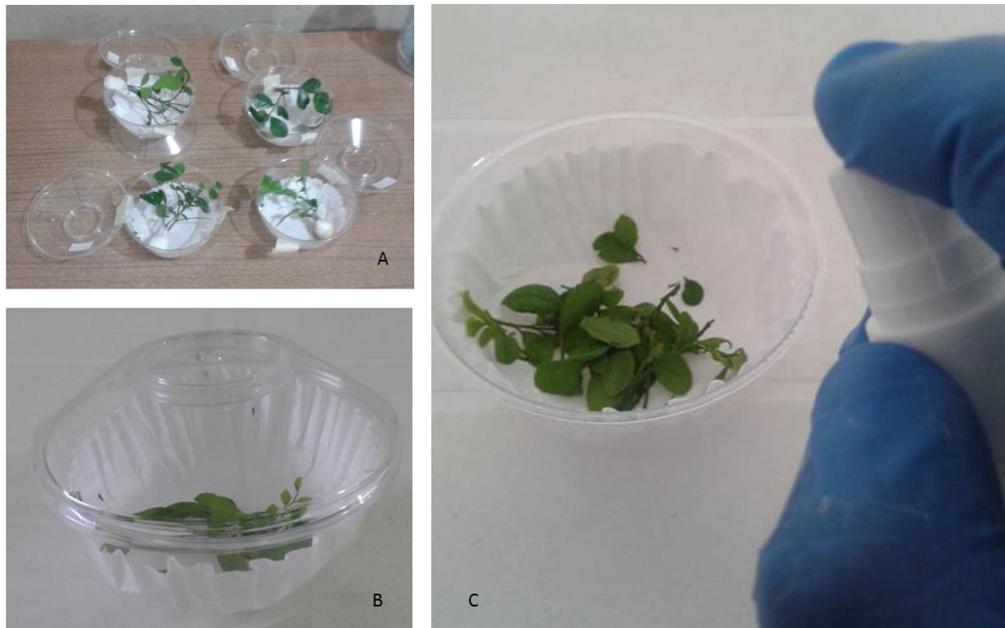
Para la prueba de patogenicidad de los hongos entomopatógenos sobre adultos y ninfas de *D. citri* se siguió la metodología propuesta por Padulla; Alves (2009). Se seleccionaron adultos de ambos sexos de la generación F2, que presentaron mayor movilidad, provenientes de la cría de insectos libres de patógenos. Se seleccionaron ninfas del segundo al quinto instar, de la tercera generación en brotes tiernos con buenas condiciones de turgencia, coloración, tamaño y que estuvieran infestados con ninfas de *D. citri*. A cada brote se le colocó en el extremo inferior un algodón previamente humedecido en agua destilada esteril para mantener su turgencia.

Los adultos y las ninfas de *D. citri*, se colocaron por separado en vasos de plástico tipo veneciano (figura 2-3). Se asperjaron con 3 ml de cada una de las suspensiones de conidios con una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/ml por medio de aspersores plásticos. Se utilizó un tratamiento testigo con agua destilada esteril con solución Tween 80 al 0.1 % y un control no tratado. Los tratamientos se mantuvieron a temperatura ambiente  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y humedad realtiva de  $75 \pm 3\%$ .

Se evaluó la mortalidad de las ninfas y de los adultos a los cinco y seis días respectivamente después de la aplicación de las suspensiones. Se contabilizaron ninfas y adultos muertos. De las ninfas y adultos muertos no micosados se seleccionaron varios

individuos por tratamiento y se colocaron en cámaras húmedas para facilitar el crecimiento de micelio y comprobar la infección del insecto. El experimento se repitió dos veces.

**Figura 2-3:** Materiales utilizados para las pruebas de patogenicidad de los hongos.



A. Vasos tipo veneciano con brotes tiernos infestados de *D. citri* B. Vasos tipo veneciano con adultos de *D. citri*, en el interior se observan insectos y los brotes de *M. paniculata*. C. Aspersor utilizado para la aplicación de las esporas de los hongos.

#### **2.1.14 Prueba de patogenicidad de los hongos entomopatógenos en adultos de *D. citri* en plántulas de *M. paniculata*.**

La prueba se realizó en el municipio de Palmira. Se seleccionaron adultos de ambos sexos de *D. citri*, provenientes de la cría. Se transfirieron a plantas de mirto (*M. paniculata*) sembradas en bolsas de polietileno negras, calibre 9 x 2. Se cubrieron individualmente con una malla entomológica (80cm de largo y 60 de ancho), atada en los dos extremos de la planta para evitar escape de adultos (figura 2–4). Se asperjó 5 ml de cada una de las suspensiones de conidios ( $1 \times 10^{-6}$  conidios/ml) cubriendo toda el área foliar de la planta de mirto, para garantizar que las esporas de los hongos entren en

contacto con los insectos. Las plantas con los diferentes tratamientos se dispusieron en una área de 20m<sup>2</sup> con una temperatura promedio de 27°C y una humedad reativa promedio de 75%. Se cubrió la parte aérea con una poli sombra al 80% a 100 centímetros por encima de las plantas, para evitar el efecto nocivo de los rayos ultravioleta sobre las esporas. Se mantuvieron con riego diario, con el fin de brindar condiciones de humedad apropiadas para el desarrollo del hongo. El ensayo únicamente se realizó en adultos de *D.citri*.

**Figura 2-4** Plantas de mirto (*M. paniculata*) utilizadas en el bioensayo en adultos de *D. citri*.



A. planta de mirto de aproximadamente 40 cm. B. Planta de mirto cubierta con malla entomológica.

Se evaluó la mortalidad causada por los hongos en los adultos de *D. citri* a los 7 días después de la inoculación. Los insectos muertos se seleccionaron individualmente por cada tratamiento y se colocaron en cámaras húmedas para facilitar el crecimiento de micelio y comprobar la infección.

### 2.1.15 Diseño estadístico

Las pruebas de patogenicidad de ninfas y adultos se realizaron bajo un diseño de bloques completos al azar, que incluyó diez tratamientos; ocho tratamientos corresponden a los hongos entomopatógenos (5 de *B. bassiana*, y 3 de *M. anisopliae*), un testigo con agua destilada estéril con solución Tween 80 al 0.1 % y un control no tratado, con cuatro repeticiones por aislamiento y 20 individuos por repetición. Los porcentajes de mortalidad se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SAS 9.4 (SAS Institute Inc., 2012)

Los datos obtenidos de mortalidad para las pruebas de patogenicidad de ninfas y adultos en condiciones de laboratorio fueron corregidos mediante la fórmula de Abbott (1925), debido a que se registró mortalidad en el testigo. Los porcentajes fueron transformados mediante la fórmula  $\text{Arco sen} \sqrt{x}$ , para normalización de los datos.

$$MC = \frac{MTTO - MT \times 100}{100 - MT}$$

MC: Mortalidad Corregida (%)

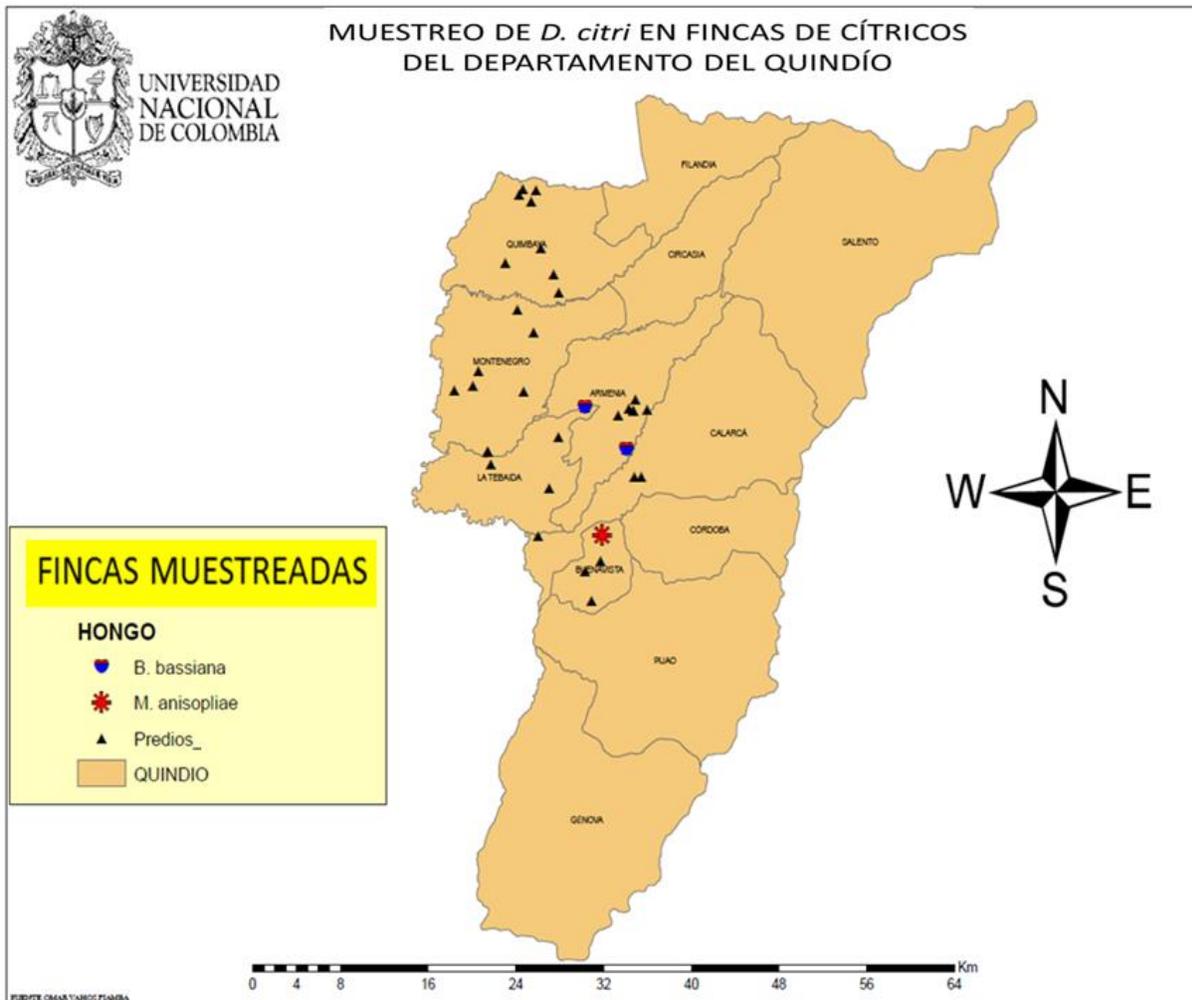
MTTO: Mortalidad Tratamiento (%)

MT: Mortalidad Testigo (%)

## 2.2 Resultados

Se visitaron 71 fincas productoras de cítricos y cuatro cercos vivos de *M. paniculata*, donde se realizaron observaciones a 770 árboles de cítricos. *D. citri* se detectó en el 65% de las fincas visitadas. Se colectaron adultos muertos de *D. citri*, aparentemente micosados en las fincas: La Primavera, Paraguaicito y Caney en el departamento del Quindío (Figura 2- 5) y las fincas El Castillo y La Primavera ubicadas en el municipio de Caicedonia, Valle del Cauca (Figura 2- 6). También se colectaron insectos infectados en dos cercos naturales de mirto (*M. paniculata*) de los municipios de La Unión y Tuluá (Valle del Cauca). (Anexo D)

**Figura 2-5:** Mapa del departamento del Quindío (Colombia) con la geo posición de los predios muestreados.



**Figura 2-6** Mapa del departamento del Valle del Cauca con la geo posición de los predios muestreados.



### 2.2.1 Identificación de aislamientos de hongos entomopatógenos

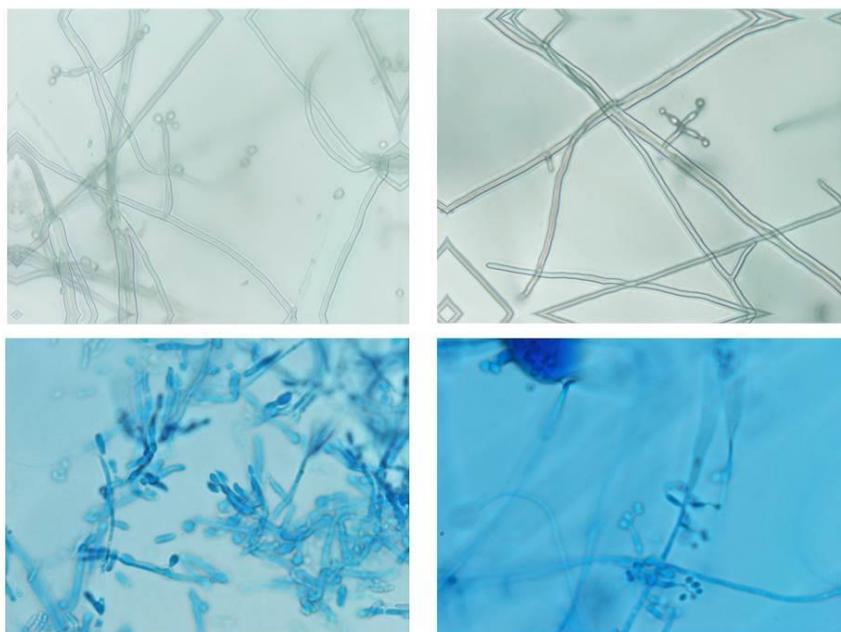
Se aislaron ocho cepas de hongos entomopatógenos. Los aislamientos CQ Caney 1, CQ Caney 3, CV Castillo 1 y CV Primavera 2 se obtuvieron a partir de los insectos sembrados directamente sobre el medio PDAY, previo a una selección de 15 aislamientos de hongos, de los cuales, ocho se sometieron a una prueba inicial de patogenicidad. Los siete restantes no se sometieron a la prueba por que se contaminaron y se eliminaron. Los aislamientos CQ La Primavera, CV La Unión, CV Tres esquinas y

CQ Paraguacito se obtuvieron a partir del proceso de maceración de los insectos por observación de sus características morfológicas.

La técnica de microcultivo permitió identificar que los ocho aislados obtenidos anteriormente pertenecen a los generos *Beauveria* y *Metarhizium*, a los que se les estudiaron sus características microculturales más notables. Para el género *Beauveria* se observaron hifas septadas, lisas, filiales hinchadas que se adelgazan hacia la parte que sostienen las esporas, conidias hialinas y lisas (Figura 2-7), para el género *Metarhizium* se observaron hifas septadas, de color verde con extremos redondeados y agrupadas en cadena (Figuras 2-8).

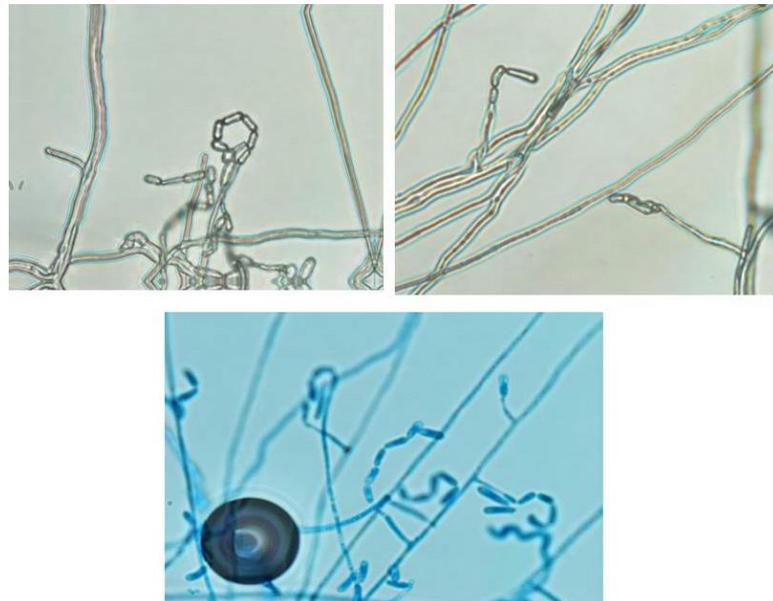
Durante el proceso de aislamiento y a partir de observaciones al microscopio (40X) se determinó también la presencia de hongos perteneciente al género *Fusarium* sp., *Curvalaria* sp., *Pestalotia* sp. y *Aspergillus* sp., considerados como hongos oportunistas y/o contaminantes (Barnett; Hunter 1987), los cuales se excluyeron del estudio.

**Figura 2-7:** Estructuras microscópicas del hongo *B. bassiana*.



Fuente: Ramos. 2014.

**Figura 2-8:** Estructuras microscópicas del hongo *M. anisopliae*.



Fuente: Ramos. 2014.

**Figura 2-9:** Hongos entomopatógenos, generos *Beauveria* y *Metarhizium* aislados de adultos de *D. citri* muertos.



Fuente: Ramos. 2014.

En la identificación molecular, cinco aislados correspondieron a la especie *Beauveria bassiana* y tres a *Metarhizium anisopliae* (Tabla 2-1). Las cepas de *B. bassiana* fueron aisladas de los insectos colectados en las fincas de La Primavera, Caney y en los cercos vivos de mirto. Las cepas de *M. anisopliae*, fueron aisladas de los insectos colectados en las fincas. Paraguaicito, La Primavera y Castillo (Tabla 2-1).

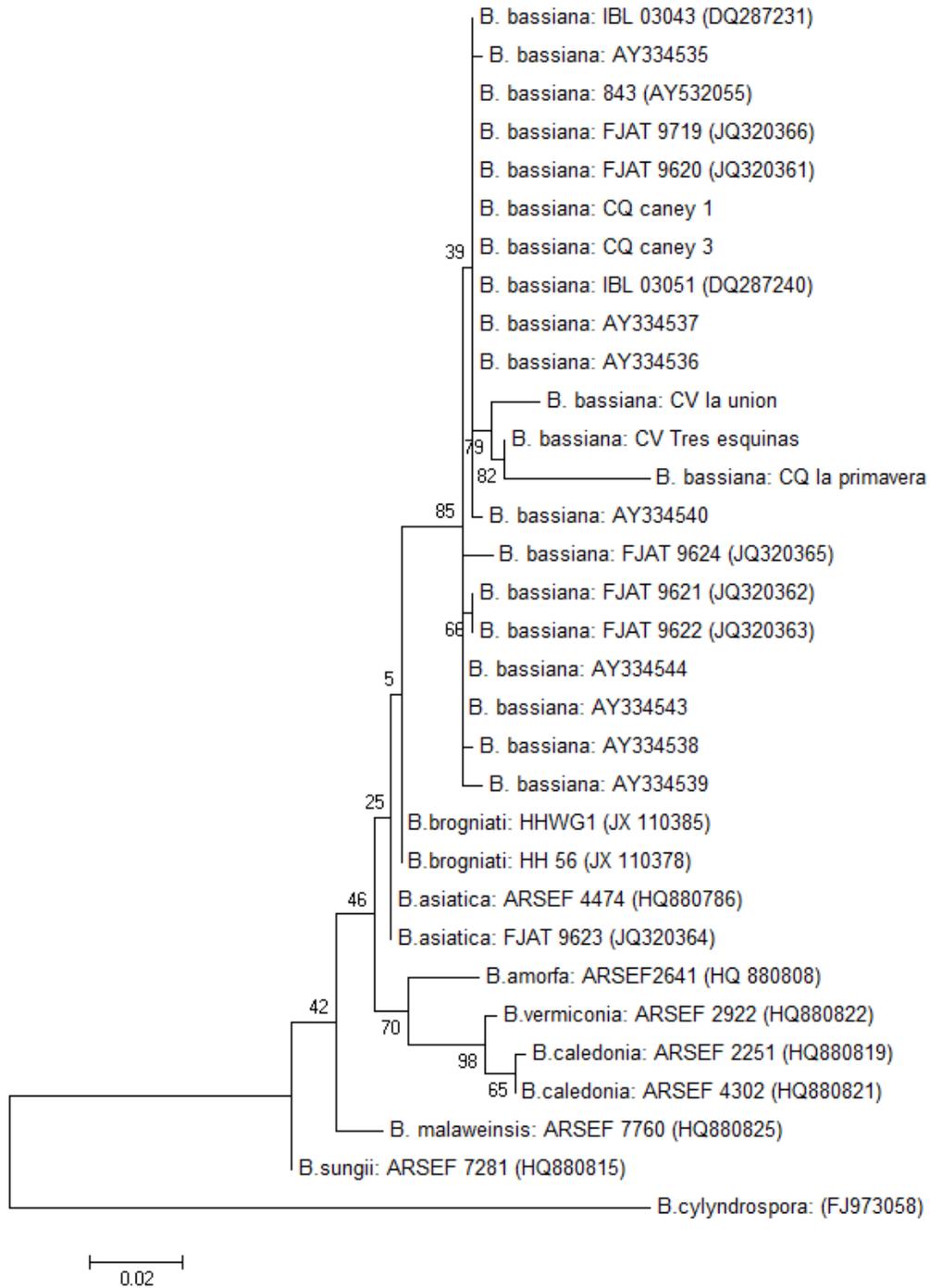
**Tabla 2-1:** Identificación molecular de los aislamientos a partir de adultos muertos de *D. citri* con la extracción del ADNr y la comparación de secuencias con el algoritmo BLAST

AISLAMIENTO	ESPECIE	IDENTIDAD %	PUNTUACION MAXIMA	VALOR E
CQ La Primavera	<i>Beauveria bassiana</i>	99	821	0.0
CV La Unión	<i>Beauveria bassiana</i>	100	754	0.0
CQ Paraguaicito	<i>Metarhizium anisopliae</i>	100	726	0.0
CV Tres esquinas	<i>Beauveria bassiana</i>	100	833	0.0
CQ Caney 1	<i>Beauveria bassiana</i>	99	695	0.0
CQ Caney 3	<i>Beauveria bassiana</i>	100	782	0.0
CV Castillo 1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	100	693	0.0
CV Primavera 2	<i>Metarhizium anisopliae</i>	100	839	0.0

Las secuencias se sometieron a un análisis filogenético y los dendrogramas obtenidos permitieron identificar que para el hongo *B. bassiana* los aislamientos obtenidos en la presente investigación están dentro del grupo de *B. bassiana* en el que se incluyen 18 accesiones (desde *B. bassiana* IBL 03043 a *B. bassiana* AY 334539), este grupo incluyó los hongos de CENICAFE y las cepas reportadas en China por Ruan et al., (2010).

En el Dendrograma de *B. bassiana* se observa que las cepas obtenidas a partir de adultos de *D. citri* en el Valle del Cauca y Quindío formaron dos grupos (variabilidad genética cercana a 0,02). En el primer grupo se encuentran las cepas CQ Caney 1 y CQ Caney 3, muy cercanas a las accesiones FJAT 9620 y FJAT 9719 y el segundo grupo encontramos las cepas CQ La Primavera, CV La Unión, CV Tres Esquinas, cercanas a las accesiones AY 334536 y FJAT 9624 (Figura 2-10).

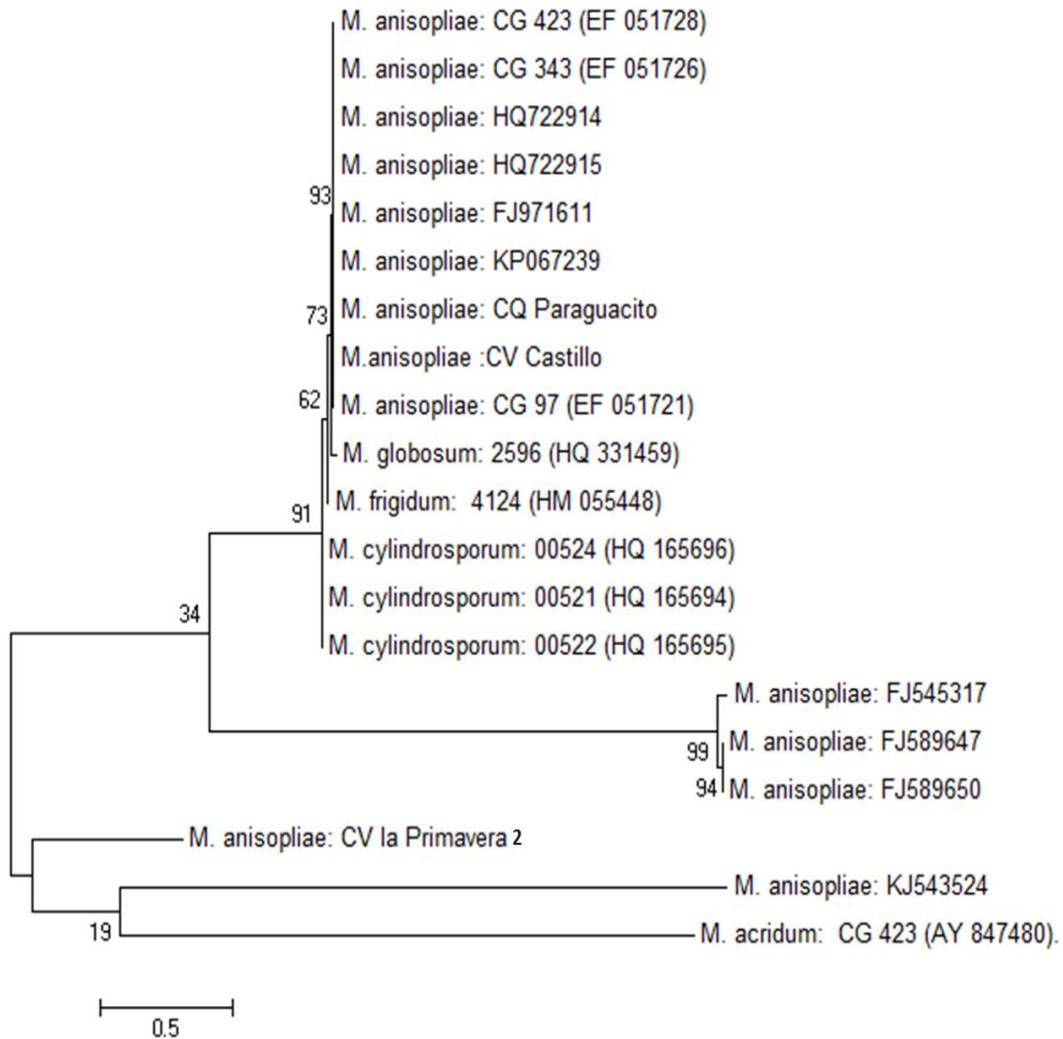
**Figura 2-10:** Dendrograma de las secuencias del hongo *B. bassiana* empleando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Tamura - Nei, con un modelo de 1000 Bootstrap.



Nota: los valores que aparecen en cada rama representan los valores bootstrap

El dendrograma de *M. anisopliae* (Figura 2-11), mostró variabilidad genética entre las cepas y se observó la formación de cuatro grupos con un coeficiente de similitud cercano a 0,5. Las cepas CQ Paraguacito y CV Castillo se ubicaron en el grupo principal entre las accesiones KP 067239 y CG 97 que correspondieron a *M. anisopliae*. La cepa CV La Primavera, formo un grupo independiente que demuestra la variabilidad genética de las cepas.

**Figura 2-11:** Dendrograma de las secuencias del hongo *M. anisopliae* empleando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Tamura - Nei, con un modelo de 1000 Bootstrap.



Nota: los valores que aparecen en cada rama representan los valores bootstrap

## 2.2.2 Porcentaje de mortalidad en ninfas de *D. citri* en condiciones de laboratorio

Para la variable de respuesta, el porcentaje promedio de mortalidad de ninfas de *D. citri* en condiciones de laboratorio cuando fueron asperjadas con  $1 \times 10^6$  esporas/ml, el análisis de varianza mostró efecto de los tratamientos en ninfas tanto de Quindío ( $F= 64.7 < P= 0.0001$ ) como del Valle del Cauca ( $F= 73,64 < P= 0.0001$ ).

**Tabla 2-2:** Porcentaje de mortalidad de ninfas de *D. citri*, colectadas en el departamento del Quindío e inoculadas con las cepas aisladas de adultos muertos de *D. citri*, ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $75 \pm 3\%$  HR, Palmira, 2014).

TRATAMIENTO	HONGO	% MORTALIDAD	D.E
T5. CQ Caney 1	<i>B. bassiana</i>	93,75 a	12,7
T8. CV Primavera 2	<i>M. anisopliae</i>	93,75 a	9,55
T6. CQ Caney 3	<i>B. bassiana</i>	91,25 a	8,91
T4. CV Tres esquinas	<i>B. bassiana</i>	84,38 ab	12,1
T3. CQ Paraguaicito	<i>M. anisopliae</i>	82,50 ab	12,7
T7. CV Castillo 1	<i>M. anisopliae</i>	81,25 ab	13,4
T1. CQ La Primavera	<i>B. bassiana</i>	77,50 ab	15,3
T2. CV La Unión	<i>B. bassiana</i>	65,63 b	15,3
T.9 Testigo absoluto		3,75 c	5,18
T10. Sin tratar		3,13 c	7,04

Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas según el análisis (Tukey  $p < 0.05$ ). D.E. Desviación Estándar.

**Tabla 2-3:** Porcentaje de mortalidad de ninfas de *D. citri*, colectadas en el departamento del Valle del Cauca, e inoculadas con las cepas aisladas a partir de adultos muertos de *Diaphorina citri*, ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $75 \pm 3\%$  HR, Palmira, 2014).

TRATAMIENTO	HONGO	% MORTALIDAD	D.E
T5. CQ Caney 1	<i>B. bassiana</i>	95,63 a	10,8
T6. CQ Caney 3	<i>B. bassiana</i>	93,75 a	12,7
T8. CV Primavera 2	<i>M. anisopliae</i>	93,75 a	12,1
T7. CV Castillo 1	<i>M. anisopliae</i>	91,25 a	10,8
T1. CQ La Primavera	<i>B. bassiana</i>	90,00 a	12,1
T2. CV La Unión	<i>B. bassiana</i>	87,50 a	13,4
T4. CV Tres esquinas	<i>B. bassiana</i>	87,50 a	10,8
T3. CQ Paraguaicito	<i>M. anisopliae</i>	85,63 a	17,8
T.9 Testigo absoluto		8,75 b	10,1
T10. Sin tratar		2,50 b	7,07

Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas según el análisis (Tukey  $p < 0.05$ ). D.E. Desviación Estándar.

En la localidad del Quindío, la prueba de comparación (Tukey  $p < 0,05$ ) indicó mayores porcentajes de mortalidad para los tratamientos CQ Caney 1, CV Primavera 2 y CQ Caney 3, en tanto, el tratamiento CV La Unión mostró menor porcentaje de mortalidad; los tratamientos CQ La Primavera, CQ Paraguaicito, CV Tres esquinas y CV Castillo 1 no presentaron diferencias con respecto a los demás aislamientos (Tabla 2-2). En la localidad del Valle del Cauca la prueba de comparación (Tukey  $p < 0,05$ ) no mostro diferencias significativas entre los aislamientos (Tabla 2-3). El porcentaje de mortalidad de las ninfas fluctuó entre 65.63 y 93.75%, para el Quindío y entre 85.63 y 95.63%, para el Valle del Cauca, lo que indica que los tratamiento son patogénicos a las ninfas de *D. citri* en condiciones de laboratorio. En el testigo absoluto se presentó mortalidad en las ninfas de 3.75 y 8.75% para el Quindío y Valle del Cauca, respectivamente.

**Figura 2-12;** Ninfas de *D. citri* infectadas con hongos entomopatógenos después de 5 días de inoculación bajo condiciones de laboratorio.



Las ninfas infectadas por el hongo *M. anisopliae*, corresponde a la foto A (Cepa CV Primavera 2) y las ninfas infectadas por el hongo *B. bassiana*, corresponden las fotos: B (Cepa CQ caney 1), C (Cepa CQ Caney 3) y D (Cepa CV La Unión) (10x). Foto: Ramos, 2014.

### 2.2.3 Porcentaje de mortalidad en adultos de *D. citri* en condiciones de laboratorio

Para la variable de respuesta porcentaje de mortalidad de adultos de *D. citri* en condiciones de laboratorio cuando fueron asperjadas con hongos en una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/ml, el análisis de varianza mostró efecto de los tratamientos en adultos de la zona de Quindío ( $F = 42.69 < P = 0.0001$ ) y la zona del Valle del Cauca ( $F = 16.81 < P = 0.0001$ ).

**Tabla 2-4:** Porcentaje de mortalidad de adultos de *D. citri* procedentes del Quindío e inoculados con cepas aisladas de adultos muertos de *Diaphorina citri*, ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $75 \pm 3\%$  HR, Palmira, 2014).

TRATAMIENTO	HONGO	% MORTALIDAD	D.E
T8. CV Primavera 2	<i>M. anisopliae</i>	84,38 a	14,1
T3. CQ Paraguaicito	<i>M. anisopliae</i>	83,75 a	10,8
T5. CQ Caney 1	<i>B. bassiana</i>	81,88 a	12,1
T4. CV Tres esquinas	<i>B. bassiana</i>	78,75 a	12,7
T1. CQ La Primavera	<i>B. bassiana</i>	76,88 a	8,28
T6. CQ Caney 3	<i>B. bassiana</i>	76,88 a	11,5
T2. CV La Unión	<i>B. bassiana</i>	74,38 a	10,7
T7. CV Castillo 1	<i>M. anisopliae</i>	73,13 a	12,7
T9. Testigo absoluto		46,25 b	17,7
T10.Sin tratar		6,88 b	8,83

Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas según el análisis Tukey ( $F= 42.69 < P= 0.0001$ ). D.E. Desviación Estándar.

**Tabla 2-5:** Porcentaje de mortalidad de adultos de *D. citri* colectados en el Valle del Cauca e inoculados con cepas aisladas de adultos muertos de *Diaphorina citri*, ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $75 \pm 3\%\text{HR}$ , Palmira, 2014).

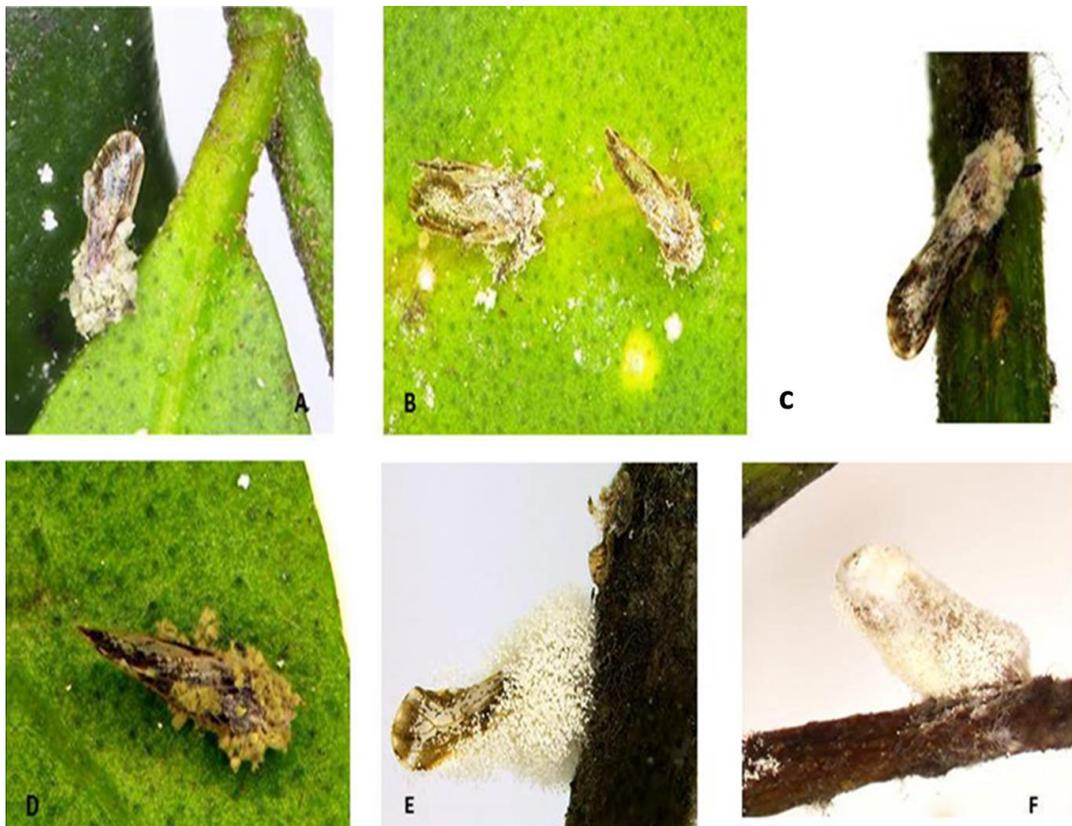
TRATAMIENTO	HONGO	% MORTALIDAD	D.E
T4. CV Tres esquinas	<i>B. bassiana</i>	83,75 a	17,8
T3. CQ Paraguaicito	<i>M. anisopliae</i>	80,00 ab	26,1
T7. CV Castillo 1	<i>M. anisopliae</i>	80,00 ab	6,36
T8. CV Primavera 2	<i>M. anisopliae</i>	78,75 ab	11,5
T6. CQ Caney 3	<i>B. bassiana</i>	78,13 ab	20,4
T5. CQ Caney 1	<i>B. bassiana</i>	77,50 ab	15,3
T1. CQ La Primavera	<i>B. bassiana</i>	73,13 ab	15,3
T2. CV La Unión	<i>B. bassiana</i>	66,23 b	17,8
T9. Testigo absoluto		53,75 c	9,54
T10.Sin tratar		15,63 c	14,8

Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas según el análisis Tukey ( $F= 16.81 < P= 0.0001$ ). D.E. Desviación Estándar.

El porcentaje de mortalidad de adultos de *D. citri* bajo condiciones de laboratorio con una temperatura de  $26\pm 2^\circ\text{C}$  y humedad realtiva de  $75\pm 3\%$  realizado en el primer semestre de 2014 en el Quindío, no presentó diferencias significativas entre aislamientos (Tabla 2-4).

En el Valle del Cauca, el tratamiento CV La Unión presentó el porcentaje más bajo de mortalidad en adultos con el 66,23%, siendo estadísticamente diferente del tratamiento CV Tres Esquinas que presentó el mayor porcentaje de mortalidad con 83.75%. Los tratamientos CQ La Primavera, CQ Paraguaicito, CQ Caney 1, CQ Caney 3 y CV Castillo 1 no presentaron diferencias con respecto a los demás (Tabla 2-5) ( $F= 16.81 < P= 0.0001$ ). Todos los tratamientos de hongos mostraron patogenicidad sobre adultos de *D. citri* (Figura 2-13). El tratamiento testigo presentó mortalidad sobre adultos en las dos localidades, los insectos muertos en el testigo no presentaron esporulación. La esporulación soporta los resultados, denotando que la muerte se devió a la acción de los hongos inoculados.

**Figura 2-13:** Adultos infectados con hongos entomopatógenos después de 6 días de la aspersión bajo condiciones de laboratorio.

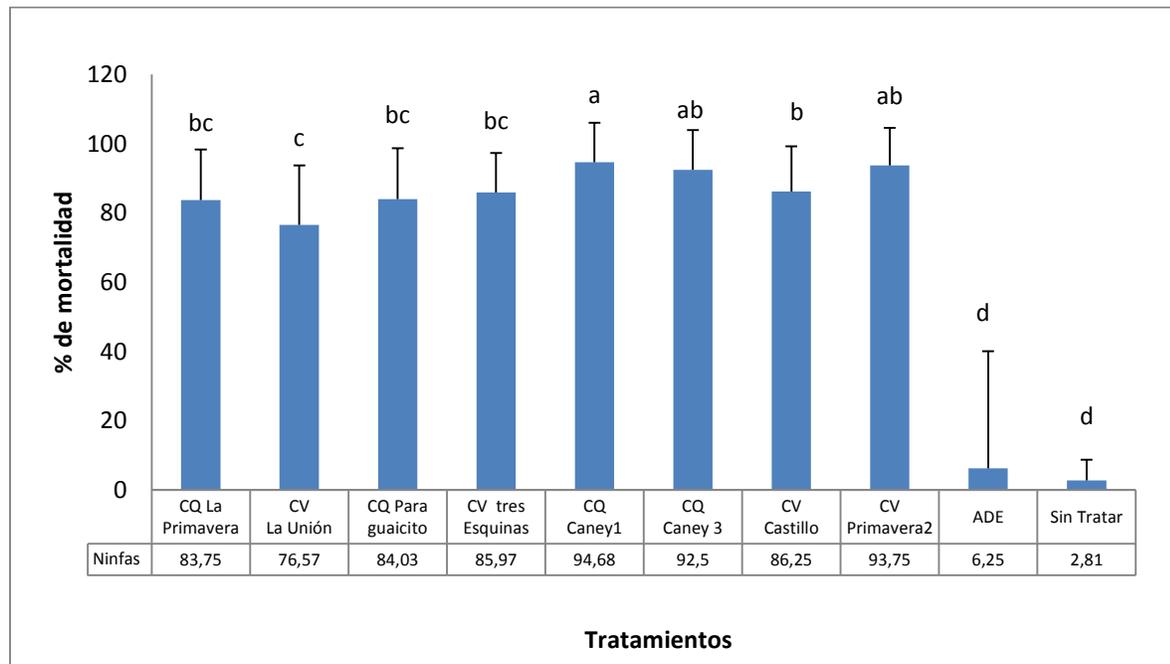


Los adultos infectados por el hongo *M. anisopliae* corresponden a las fotos: A (Cepa CQ Paraguaicito), C (CV Castillo1), y D (Cepa CV Primavera 2) y los adultos infectados por el hongo *B. bassiana* corresponden a las fotos B (Cepa CQ caney1), E (Cepa CQ Caney 3) y F (Cepa CV Tres Esquinas) (10X) departamentos de Quindío y Valle del Cauca, Colombia. Foto: Ramos, 2014.

### 2.2.4 Porcentaje de mortalidad en ninfas y adultos de *D. citri* en las dos localidades

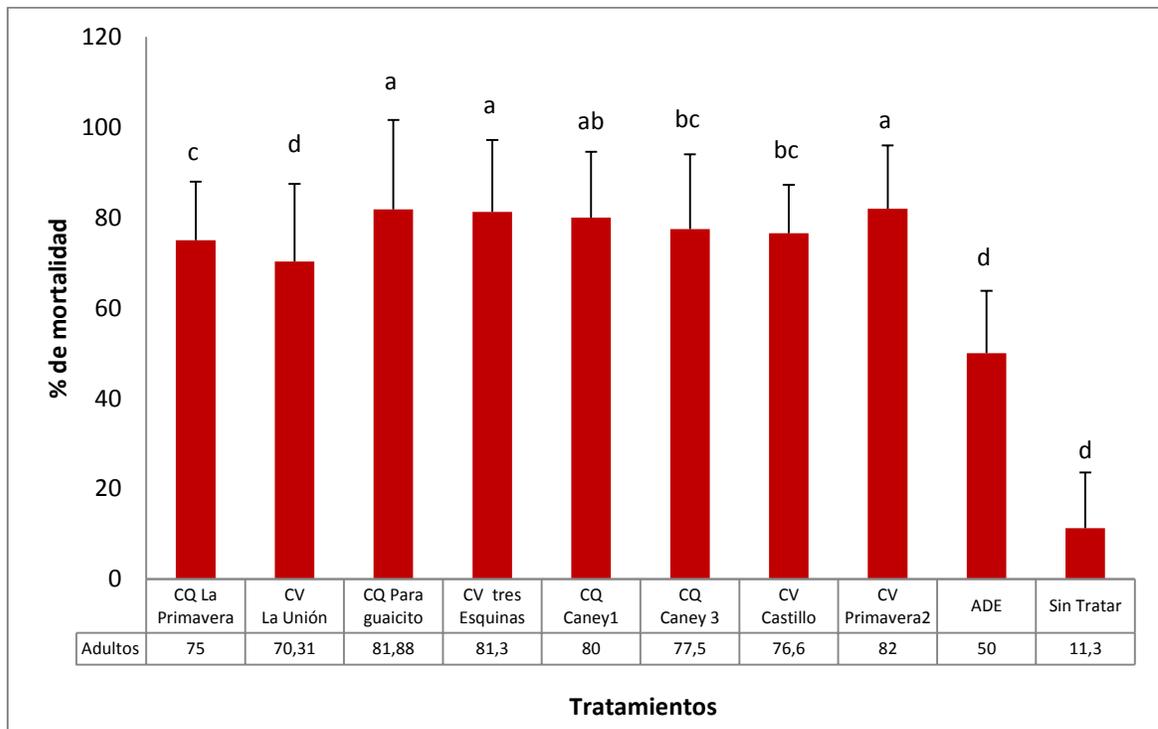
El porcentaje de mortalidad en las dos localidades para ninfas y adultos de *D. citri*, según el análisis de varianza (ANOVA), presentó diferencias significativas entre tratamientos ( $F= 173.48 < P. 0.0001$ )

**Figura 2-14:** Porcentaje de mortalidad de ninfas de *D. Citri* ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $75 \pm 3\%$  HR, Palmira, 2014).



Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas. ADE. Agua Destilada Estéril.

**Figura 2-15:** Porcentaje de mortalidad de adultos de *D. Citri* ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $75 \pm 3\%$  HR, Palmira, 2014).



Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas. ADE. Agua Destilada Estéril.

El porcentaje de mortalidad para ninfas mostró que el tratamiento CQ Caney 1 presentó el mayor porcentaje de mortalidad y difiere estadísticamente en su patogenicidad de los tratamientos CQ La Primavera, CV La Unión, CQ Paraguaicito, CV Tres esquinas y CV Castillo 1. Los tratamientos CQ Caney 3 y CV La Primavera 2 no difieren estadísticamente de los demás aislados (Figura 2-14). Para adultos se destacan los tratamientos CQ Paraguaicito, CV Tres Esquinas y CV La Primavera 2 con los mayores porcentajes de mortalidad. Se observa diferencias significativas en su patogenicidad con los tratamientos CQ La Primavera, CV La Unión, CQ Caney 3 y CV Castillo 1 ( $F= 173.48 < P. 0.0001$ ) (Figura 2-15). El tratamiento CV La Unión presentó el menor porcentaje de mortalidad para ninfas y adultos. El porcentaje de mortalidad promedio para ninfas fluctuó entre 75.63 y 94.69%, en adultos la mortalidad osciló entre 69.63 y 84.6%.

**Tabla 2-6:** Porcentaje de mortalidad de *D.citri*, con relación al estado de desarrollo del insecto y la localidad evaluada ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $75 \pm 3\%$  HR, Palmira, 2014).

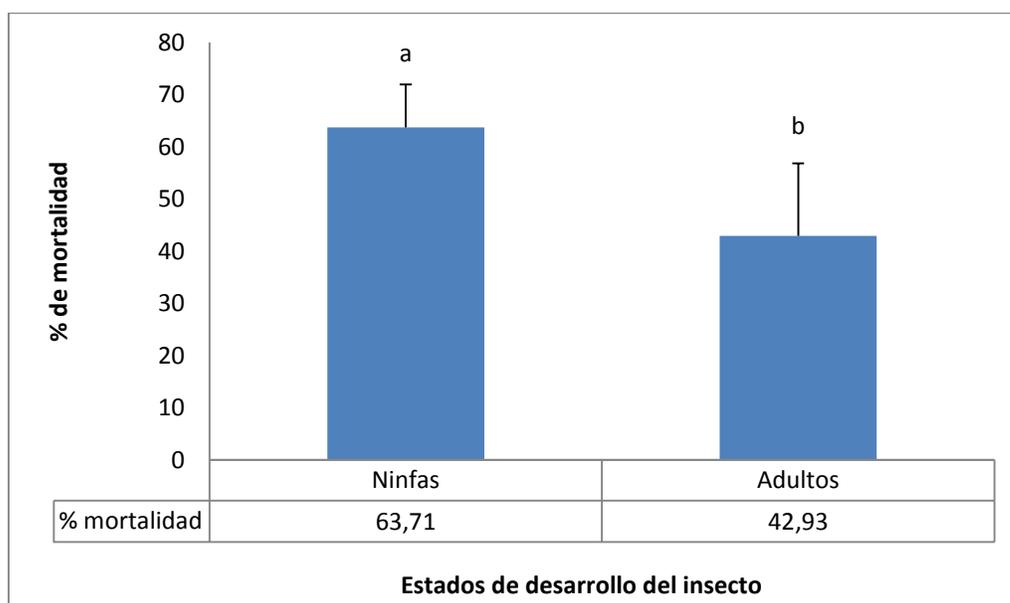
64 Identificación de hongos entomopatógenos de *Diaphorina citri* Kuwayama, en los departamentos del Valle del Cauca y Quindío, Colombia

Localidad	Laboratorio				Sobre plantulas de <i>M. paniculata</i>		% mortalidad de ninfas + adultos en laboratorio
	Ninfas		Adultos		Adultos		
	% mortalidad	D.M.S.	% mortalidad	D.M.S.	% mortalidad	D.M.S.	
Valle del Cauca	66.24 a	0,3	40.12 b	0,4	21,15 a	0,16	53.43 a
Quindío	60,50 b	0,29	45.22 a	0,27	16,90 b	0,18	53.45 a

Valores con la misma letra dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas según el análisis de Tukey ( $P < 0.05$ ). D.M.S Diferencia Mínima Significativa.

El porcentaje de mortalidad no mostró diferencias significativas entre localidades en condiciones de laboratorio ( $F = 0,03 > P = 0,8595$ ). Sin embargo, existen diferencias significativas para la relación entre el estado y las localidades ( $F = 16,84 < P = 0.0001$ ) (Tabla 2-6) siendo mayor para las ninfas. El porcentaje de mortalidad de las ninfas difiere significativamente con el porcentaje de mortalidad de adultos. Las ninfas son más susceptibles que los adultos a la infección por hongos en condiciones de laboratorio ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $75 \pm 3\%$  HR, Palmira, 2014) (Figura 2-16).

**Figura 2-16:** Porcentaje de mortalidad de *D.citri* por estado de desarrollo del insecto



### 2.2.5 Mortalidad promedio de adultos *D. citri*, sobre plántulas de *M. paniculata*.

Los hongos fueron patogénicos contra adultos de *D. citri*, expuestos a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas. El porcentaje de mortalidad de adultos para la zona del Quindío ( $F = 12,48 < P = 0.0001$ ) y el Valle del Cauca ( $F = 27,42 < P = 0.0001$ ) mostró diferencias significativas entre tratamientos.

La mortalidad promedio de adultos en el Quindío no mostró diferencias significativas entre la patogenicidad de las cepas (Tabla 2-7). En el Valle del Cauca el tratamiento CQ La Primavera presentó el mayor porcentaje de mortalidad con el 27,5%, en tanto, el tratamiento CV Tres Esquinas mostró el menor porcentaje de mortalidad con 12,5%; los tratamientos CV La Unión, CQ Paraguaicito, CQ Caney 1, CV Castillo 1 y CV Primavera 2 no presentaron diferencias con respecto al tratamientos CQ La primavera y CQ Caney 3, pero difieren estadísticamente del tratamiento CV Tres Esquinas (Tabla 2-8).

**Tabla 2-7:** Porcentaje de mortalidad promedio de adultos de *D. citri* procedentes del departamento del Quindío, sobre plántulas de *M. paniculata*. (27°C. y 75% HR, Palmira, 2014).

TRATAMIENTO	% MORTALIDAD PROMEDIO	D.E.
T1. CQ La Primavera	15,00 a	5,37
T3. CQ T4. Paraguaicito	13,75 a	10,8
T2. CV La Unión	12,50 a	9,55
T5. CQ Caney 1	11,88 a	5,73
T7. CV Castillo 1	11,25 a	3,18
T8. CV Primavera 2	11,25 a	8,91
T4. CV Tres esquinas	10,63 a	4,45
T6. CQ Caney 3	8,13 a	10,7
T9. Testigo absoluto	0 b	0
T10. Testigo sin tratar	0 b	0

Valores con la misma letra en la misma columna no presentan diferencias significativas según el análisis de Tukey ( $P < 0.05$ ). D.E. Desviación Estándar.

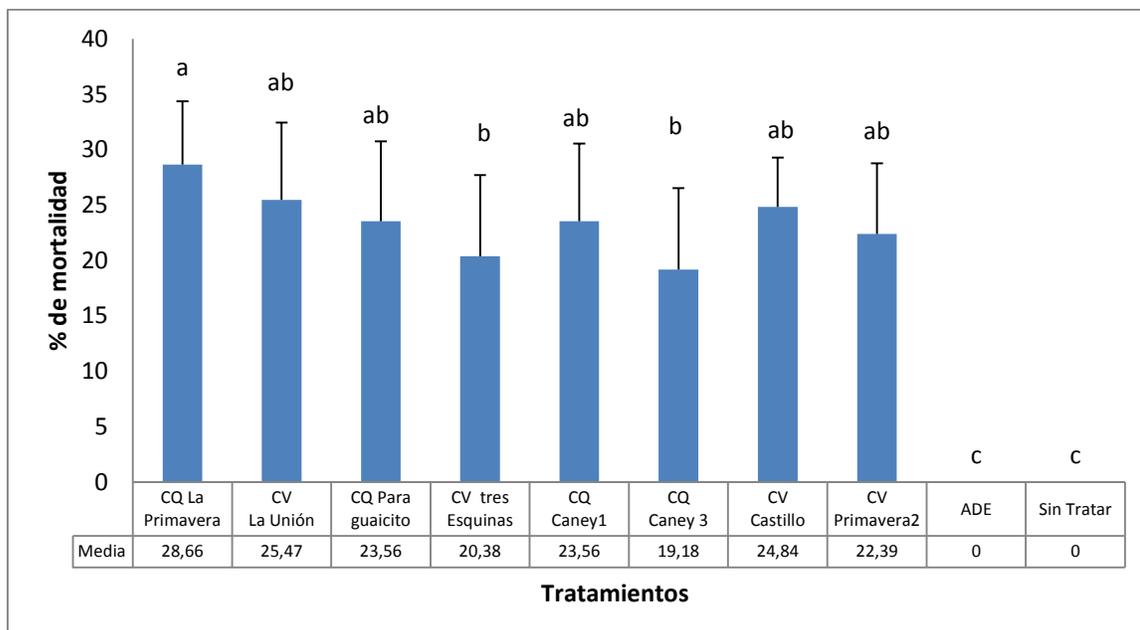
**Tabla 2-8:** Porcentaje de mortalidad promedio de adultos de *D. citri* procedentes del departamento del Valle del Cauca, sobre plántulas de *M. paniculata*. (27°C. y 75% HR, Palmira, 2014).

TRATAMIENTO	% MORTALIDAD PROMEDIO	D.E
T1. CQ La Primavera	27,50 a	6,36
T2. CV La Unión	22,50 ab	5,09
T7. CV Castillo 1	20,00 abc	5,73
T3. CQ Paraguaicito	16,88 abc	5,09
T5. CQ Caney 1	16,25 abc	8,28
T8. CV Primavera 2	15,00 abc	3,82
T6. CQ Caney 3	13,75 bc	7,01
T4. CV Tres esquinas	12,50 c	12,1
T9. Testigo absoluto	0 d	0
T10. Testigo sin tratar	0 d	0

Valores con la misma letra en la misma columna no presentan diferencias significativas según el análisis de Tukey ( $P < 0.05$ ). D.E. Desviación Estándar.

El porcentaje de mortalidad de los adultos fluctuó entre 8.13 y 15% para el Quindío y 12.5 a 27.5% para el Valle del Cauca, lo que indica que las cepas son patogénicas a los adultos de *D. citri*.

**Figura 2-17:** Porcentaje de mortalidad de adultos de *D. citri* en las dos localidades sobre plantas de mirto (*M. paniculata*).



Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas. ADE. Agua Destilada Estéril.

La mortalidad de adultos sobre plántulas de *M. paniculata* para las dos localidades arrojó diferencias significativas entre localidades ( $F=57.80 < P = 0.0001$ ). El tratamiento CQ La Primavera presentó el mayor porcentaje de mortalidad con el 28,66%, mientras los tratamientos CQ Caney 3 y CV Tres esquinas presentaron los menores porcentajes de mortalidad de adultos con 19,18 y 20,38%, respectivamente. Los tratamientos, CV La Unión, CQ Paraguaicito, CQ Caney 1, CV Castillo 1 y CV Primavera 1 no difieren estadísticamente entre los demás tratamientos (Figura 2-17).

El promedio de la mortalidad de adultos realizado sobre plántulas de *M. paniculata* para la zona del Valle del Cauca con el 21.09% difiere significativamente del promedio de la mortalidad de adultos de la zona del Quindío con 16.56% ( $F=19.61 < P = 0.0001$ ).

## 2.3 Discusión

La presencia de *D. citri* en Colombia y la reciente detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en el departamento de la Guajira, ha convertido al insecto en una amenaza para la producción citrícola, dado que como vector responsable de la transmisión de la

bacteria *Candidatus Liberibacter* spp., causa la enfermedad Huanglongbing (HLB) (Tsai; Wang; Liu, 2000).

La disminución de las poblaciones del vector es una de las estrategias recomendadas para reducir la incidencia de la enfermedad en los cultivos. Actualmente el uso de hongos entomopatógenos se considera como una de las alternativas promisorias para el control de *D. citri*, frente al manejo tradicional, como la aplicación de insecticidas sistémicos como herramienta de control que se viene utilizando. (Charnley; Collins, 2007; Gouli et al., 2008; Hall, 1981; Shahid et al., 2012), disminuyendo el riesgo de causar efectos negativos en el ambiente y en los seres humanos (Cañedo; Ames, 2004).

Teniendo en cuenta lo anterior, en la presente investigación se detalla la exploración, aislamiento, identificación molecular y evaluaciones de la patogenicidad de hongos entomopatógenos que se obtuvieron a partir de individuos de *D. citri* micosados colectados en cultivos de cítricos y cercos vivos de *M. paniculata* en los departamentos del Valle del Cauca y Quindío, en Colombia. Durante el desarrollo del trabajo se identificaron dos especies de hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*) parasitando adultos de *D. citri* en campo. Esto indica la existencia de hongos patógenos que regulan de poblaciones de *D. citri* en campo.

La identificación realizada en el presente estudio, de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* son un aporte importante para el control de *D. citri*, especialmente porque son hongos entomopatógenos que han sido reportados por diversos autores, quienes los señalan como agentes biológicos con buena capacidad para controlar eficientemente una gran variedad de plagas de interés agrícola entre ellas *D. citri* (Charnley; Collins, 2007; Gouli et al., 2008; Hall, 1981; Shahid et al., 2012).

Por otra parte, los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, son los más estudiados como biocontroladores de insectos, debido a su eficiencia y facilidad de multiplicación (Lagos, 2007), sin embargo, hay aún mucho trabajo por hacer para tener bioplaguicidas eficientes basados en hongos, siendo el primer paso para la obtención de bioinsecticidas el aislamiento, caracterización y multiplicación de estos microorganismos.

### **Identificación molecular**

Aunque la taxonomía clásica basada en características morfológicas se utiliza extensivamente en la identificación de hongos, a menudo es insuficiente para identificar unas especies cuando se utiliza solo esta herramienta, por lo que recientemente la secuenciación de genes ha sido usada para complementar las descripciones morfológicas e identificar las cepas con mayor exactitud (Petit; Gubler, 2005). En este estudio se amplificó el espaciador interno ITS de la región del ADN ribosomal con el fin de identificar los hongos aislados.

La identificación y la determinación de la diversidad genética de hongos entomopatógenos se realizó con la secuenciación de la región ITS 1 y 2 del ADNr (Coates; Hellmich; Lewis, 2002), teniendo en cuenta que es uno de los marcadores moleculares utilizado con frecuencia para identificar las especies de hongos (Rehner et al., 2006) y es eficaz en la resolución del perfil taxonómico del género *Beauveria* y en la identificación de razas en *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Hegedus; Khachatourians, 1995; Hegedus et al., 1998).

La región ITS del ADNr permitió identificar las especies *B. bassiana*, *B. asiática* y *Lecanicillium attenuatum* a partir de insectos micosados de *D. citri* (Ruan et al., 2010); y 19 cepas del hongo *B. bassiana*, 2, cepas de *M. anisopliae* y 14 cepas de *I. fumosoroseae*, procedentes de muestras de suelo de las zonas citrícolas de Mexico (Galán Franco, 2012).

### **Presencia de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en *D. citri***

Los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, son habitantes naturales, saprofitos con alta persistencia en el suelo (Sun; Liu., 2008) y su frecuencia en suelos cultivados (Quesada-Moraga et al., 2007), *B. bassiana* y *M. anisopliae* son considerados patógenos de insectos por su capacidad de adaptación sobre su hospedero, la rapidez para ingresar y causar efecto letal en el mismo, por lo que han sido determinados como organismos con características de especialistas o sea que existen algunos linajes especializados que filogenéticamente pueden infectar a un grupo específico de insectos (López et al., 1999) y una eventual capacidad para infectar insectos que no son hospederos habituales (Rehner; Buckley, 2005).

Los hongos entomopatógenos aislados a partir de adultos de *D. citri* incluyen a *Hirsutella citriformis* Speare, en Indonesia (Subandiyah et al., 2000), Isla Guadalupe (Étienne et al., 2001), México (Hall et al., 2012) y Cuba (Sandoval-Rincón et al., 2010), igualmente en México y Estados Unidos se aisló una especie no identificada del hongo *Hirsutella* sp. (Meyer; Hoy; Boucias, 2007), e identificaron los hongos *Isaria fumosorosea* (Wize) (= *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) (Samson, 1974; Subandiyah et al., 2000), *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas (*Lecanicillium lecanii*), atacando adultos de *D. citri*. También se ha reportado a *B. bassiana*, en estudios realizados por Padulla; Alves (2012) La cepa Esalq-PL63, *B. bassiana*, causó una mortalidad aproximada del 72% de las ninfas, a los siete días después de la inoculación. En China se reportó el aislamiento de 6 cepas del hongo *B. bassiana*, colectados a partir de muestras de suelo y de cadáveres micosados de adultos del psílido asiático de los cítricos sobre plantas de *Murraya* sp., en la provincia de Fujian (Ruan et al., 2010).

Para Suramerica se han reportado *B. bassiana* y *M. anisopliae* parasitando adultos de *D. citri*; (Padulla; Alves 2009; Pinto et al., 2012) y (Padulla; Alves 2009), respectivamente. En Mexico (Gandarilla-Pacheco; Arroyo; Quintero-Zapata 2013; Lezama-Gutiérrez et al., 2012) y Lezama-Gutiérrez et al., (2012) también reportaron la presencia de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, respectivamente, parasitando adultos de *D. citri*.

En Colombia, se identificaron dos generos de hongos entomopatógenos *Paecilomyces* y *Beauveria* que fueron obtenidos a partir de adultos infectados de *D. citri*. Los hongos entomopatógenos *Paecilomyces* sp., *Paecilomyces variotii*, y *Beauveria* sp., fueron colectados en el departamentos de Córdoba y *Beauveria* sp., *Paecilomyces* sp., colectados en los departamentos del Tolima y Valle del Cauca, respectivamente (CORPOICA 2014).

### **Variabilidad genética de *B. bassiana* y *M. anisopliae***

Para el análisis filogenético de *B. bassiana* se incluyeron secuencias reportadas en la base de datos de NCBI del hongo *Beauveria* aislado de adultos de café *Hypothenemus hampei* colectados en Colombia por parte de CENICAFE y de adultos de *D. citri* colectados en la provincia de Fujian, China, así como también algunas especies de *Beauveria* consideradas entomopatógenos. Para *M. anisopliae* se tomaron secuencias reportadas en la base de datos del NCBI, aisladas en Colombia e identificadas estudios

de diversidad y algunas secuencias de especies del género *Metarhizium* como *M. globosum*, *M. frigidum*, *M. cylindrosporum* y *M. acridum*.

En los dendrogramas podemos observar que el distanciamiento genético mostrado por *B. bassiana* es mínimo (0,02), sin embargo el hongo *M. anisopliae* presenta la formación de dos grupos genéticamente independientes. Estos resultados no son contundentes, por lo que se recomienda hacer nuevos estudios con diferentes marcadores moleculares como RAPD, RLFP y SSR, los cuales permitan complementar y evidenciar mejor la diferenciación genética entre los aislados (Becerra, et al., 2007).

### ***Beauveria bassiana***

Un número creciente de estudios apuntan a una amplia correlación de los aislados fúngicos con su lugar de origen y/o hábitats (Wang et al., 2003). Para *B. bassiana*, los factores que pueden influir en su estructura son muchos e incluyen condiciones climáticas, variación en la temperatura en el que los diversos aislados pueden crecer en la naturaleza, el nivel de humedad, la exposición a rayos UV, el hábitat, el sistema de cultivo y las propiedades del suelo (Ghikas; Kouvelis; Typas, 2010). En este estudio, los resultados obtenidos en el análisis filogenético no permitieron establecer una correlación entre el hospedero y su zona de procedencia, puede explicarse porque los hongos proceden de zonas cítricas del Valle del Cauca y Quindío las cuales hacen parte del núcleo productivo del sur occidente colombiano. Estas zonas cuentan condiciones climáticas favorables para la producción de cítricos (MINAGRICULTURA, 2012).

En la figura 2-10 se observa que las cepas de *B. bassiana*: CV La Unión, CQ la Primavera y CV Tres Esquinas son muy cercanas a las cepas de CENICAFE AY 334536 y AY 334540, que son cepas aisladas de *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) y consideradas como precursoras de las cepas comerciales para la elaboración de bioinsumos que se utilizan en los dos departamentos para el control de plagas en diversos cultivos. Los agricultores, de la zona de estudio comentan sobre aplicaciones frecuentes de productos comerciales como “Micosis WP” o “Tropimezclas® WP” para el control de la broca del café y del picudo de los cítricos *Compsus* n. sp. (Coleoptera: Curculionidae).

Por lo anterior es posible que los aislamientos encontrados correspondan a cepas del hongo *B. bassiana* que se aislaron de adultos de broca del café y que por su condición de hongo entomopatogeno oportunista es capaz de atacar una amplia gama de insectos (Marin; Bustillos, 2008), por tal motivo actualmente se lo encuentra parasitando adultos de *D. citri*. Al respecto el Instituto Colombiano Agropecuario ICA, en su lista de bioinsumos registrados para Colombia menciona, que no existen bioinsumos registrados para el control de *D. citri*. Los productos biológicos existentes no están recomendados para el control de plagas en cítricos (ICA, 2015); aunque en la práctica se usan para el control de diversos insectos como el picudo de los cítricos.

La estructura genética de *B. bassiana* surge de la interacción de varios factores, como las mutaciones, la deriva genética y en algunos casos la selección y la variación de genes (Rehner; Buckley, 2005). Sin embargo, las cepas CQ Caney 1 y CQ Caney 3 se agrupan muy cerca de las cepas FJAT 9620 y FJAT 9719, aisladas de adultos de *D. citri* en la provincia de Fujian, China, que se identificaron como *B. bassiana* y se ubican dentro del grupo principal, lo anterior nos permite presumir que son cepas que presentan cierta especificidad con *D. citri*, independientemente que su sitio de origen sea geográficamente distante.

Paccola Meirelles; Azevedo (1991) mencionan que el intercambio genético de *B. bassiana* es limitado frente a la capacidad de dispersión del hongo, nos permite suponer la existencia de una población fuertemente estructurada, especialmente cuando los hongos aislados provienen del mismo hospedero. Lo anterior ratifica la cercanía de las cepas CQ Caney 1 y 3 frente a las cepas de *B. bassiana* aisladas en la provincia de Fujian, China.

Al respecto Rehner; Buckley, (2005) en un estudio de diversidad genética con aislamientos de *B. bassiana* procedentes de varias regiones del mundo, consideran que *B. bassiana* no es un hongo monofilético y consta de dos linajes no relacionados como son el clado A y C. El clado A, se distribuye en todo el mundo e incluye los teleomorfos asiáticos *Cordyceps staphylinidaecola* y su probable sinónimo *C. bassiana*, lo que explicaría el porque de la cercanía de los aislamientos identificados en este trabajo con los aislamientos identificados en Fujian, China.

El género *Beauveria* es un entomopatógeno hifomiceto que puede ser transportado por el viento, la lluvia, el suelo y el hombre. *B. bassiana* está distribuido en todo el mundo (Ruan et al., 2010).

### ***Metarhizium anisopliae***

El análisis filogenético de *M. anisopliae* se observa en la figura 2-11 que las cepas CQ Paraguaicito y CV Castillo son genéticamente similares y se ubican dentro del grupo principal de *M. anisopliae*, en cambio la cepa CV La Primavera 2 difiere genéticamente de los anteriores aislamientos y forma un grupo independiente dentro del Dendrograma, Muñoz (2015) afirma que es posible que en alguna parte de la cadena de genes exista una variación en los nucleótidos que genera la separación, conservando su clasificación (comunicación personal, Septiembre, 2015).

Al respecto Fegan et al., (1993) manifiestan que *M. anisopliae* presenta un alto grado de diversidad genética que estaría relacionada con la localización geográfica y la patogenicidad. Sin embargo, Hajek; St. Legger (1994) señalan que el aislamiento geográfico y la limitada capacidad de dispersión de las esporas de *M. anisopliae* podrían ser importantes en la evolución de los diferentes genotipos. Estos autores también mencionaron que la variabilidad intraespecífica de los hongos ha sido caracterizada por las diferencias con respecto a la patogenicidad.

La diversidad genética intraespecífica del aislamiento CV la Primavera 2 puede estar relacionado con la patogenicidad reportada sobre ninfas y adultos de *D. citri*, en este estudio, ya que este aislamiento es considerado como promisorio para el control de *D. citri*, por sus altos porcentajes de mortalidad. Varios trabajos reportan que el hongo *M. anisopliae* presenta alta variabilidad intraespecífica caracterizada por diferencias en la patogenicidad, en la variabilidad y en la susceptibilidad del hospedero, lo que demuestra la ocurrencia potencial de coevaluación entre el insecto hospedero y el patógeno, que presumiblemente evolucionaron a través de una especialización patogénica (Hajek; St. Legger, 1994).

La transición evolutiva de *Metarhizium* spp., relacionada con la patogenicidad de insectos, ha implicado adaptaciones en la nutrición del hongo debido al gran número de proteasas, lipasas y quitinasas que pueden digerir de las cutículas de los insectos y el

cuerpo del anfitrión, especialmente las quimotripsinas, que son específicas del género *Metarhizium* y puede haber sido adquirida por un evento de transferencia horizontal de genes facilitando la adaptación del hongo a nuevos entornos (Gao et al., 2011).

Muchas de las cepas de *Metarhizium* están incluidas en unas pocas clases de genotipos geográficamente distribuidos y que la persistencia de estos genotipos en el tiempo y espacio, sugiere que en muchas situaciones estos hongos han tenido una estructura poblacional clonal (Hajek; St. Legger, 1994).

Los aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* se obtuvieron a partir de psíidos infectados colectados en campo, al ser aislados de este insecto, se convierten en candidatos potenciales para ser usados como agentes de control biológico, en cultivos de cítricos, sugiriendo la especificidad de los aislamientos hacia el insecto (Restrepo Quiroz, 2015) si se compara con cepas que proceden de muestras de suelo, o de otros hospederos, puesto que estos aislamientos han crecido sobre el insecto blanco y no son cepas que puedan ser saprófitas del suelo garantizando de esta manera su efecto patogénico (Jackson; Dunlap; Jaronski, 2010). Sin embargo, Moorhouse; Gillespie; Charnley (1993) señalan que la capacidad germinativa y patogénica de los hongos entomopatógenos no obedece al hospedante original del mismo.

### **Patogenicidad de *B. bassiana* y *M. anisopliae***

Los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* presentaron patogenicidad tanto para ninfas como para adultos de *D. citri*, en condiciones de laboratorio y sobre las plántulas de *M. paniculata*, lo que concuerda con las investigaciones reportadas por Mellín-Rosas et al., (2009); Conceschi (2013); Hajek; St. Leger (1994).

En las pruebas de patogenicidad las ninfas de *D. citri* presentaron mayor susceptibilidad al ataque de hongos con un 63,71% de mortalidad que los adultos con 42,93% de mortalidad, bajo condiciones de laboratorio, posiblemente porque las ninfas presentan la cutícula menos esclerotizada lo que facilita la adhesión y penetración de la espora Conceschi (2013), aumentando la susceptibilidad de la cutícula del insecto a la germinación, penetración del tubo germinativo y finalmente el desarrollo del patógeno en el cuerpo del insecto (Hajek; St. Leger, 1994). Contrariamente los lípidos cuticulares de

los adultos podrían interferir en el proceso de infección (James, Buckner, Freeman, 2003).

Precisamente diferentes autores reportan mayor mortalidad para ninfas que para adultos de *D. citri*. Conceschi (2013) encontró una mortalidad superior al 90 % sobre ninfas del primer instar, mientras que para adultos osciló entre 59 y 74% con la aplicación del hongo *B. bassiana* en condiciones de laboratorio; resultados similares a los reportados en esta investigación. Lezama-Gutiérrez et al., (2012) también encontró mayor susceptibilidad en las ninfas que los adultos de *D. citri* cuando se asperjaron con hongos entomopatógenos en concentraciones de  $1 \times 10^8$  esporas/mL, especialmente de *M. anisopliae* en condiciones de campo.

Cabe destacar, que los aislamientos obtenidos proceden de adultos infectados en campo, lo que permite sugerir la existencia de especificidad en las distintas cepas. La especificidad es una de las características de los hongos entomopatógenos, la cual es citada como una ventaja al no dañar organismos benéficos (Glare, 1992; Tanada; Kaya, 1993; Alves, 1998). Esta característica es causada por variabilidad en cuanto a la capacidad de adherencia y/o penetración de la conidia en el integumento, además de su actividad toxicogénica (Vey; Fargues; Robert, 1982). La primera barrera que opone el insecto a la penetración del patógeno es la cutícula, la cual difiere marcadamente entre el estadio ninfal o el adulto, por lo cual, no necesariamente un buen aislamiento de entomopatógeno para adulto va a ser igualmente efectivo para las ninfas.

Otro factor relacionado con la susceptibilidad de las ninfas de *D. citri* al ataque de hongos, radica posiblemente en la menor protección cerosa comparada con la que presentan los adultos y que disminuye la colonización y penetración de los hongos (Conceschi, 2013). Resultados similares obtuvieron Padulla; Alves (2009) con aplicaciones en torre de potter en condiciones laborales, con una mortalidad en ninfas en un rango de 54 a 72% con cepas de *B. bassiana*, a una concentración de  $5 \times 10^7$  conidios mL<sup>-1</sup>; y Mellín-Rosas et al., (2009) evaluaron cepas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios mL<sup>-1</sup> obteniendo mortalidades hasta de 79.4, y 30.4% en ninfas de *D. citri*, respectivamente.

Ruan et al., (2010) encontraron mortalidades que oscilaron entre 33 y 98% ocasionada por las cepas FJAT-9720, FJAT-9622, FJAT-9719 y FJAT-9623, FJAT-9620, FJAT-9621 y FJAT-9624 de *B. bassiana* en adultos de *D. citri*, siete días después de hacer la aspersión. En esa investigación, aunque la muestras de hongos aislados, excepto FJAT-9720, se originó a partir de muestras de suelo, los hongos mostraron patogenicidad contra los adultos del psílido asiático de los cítricos. La patogenicidad de *B. bassiana* sobre adultos de *D. citri* también fue reportado por Rivero Aragón; Grillo Ravelo (2000); Yang et al., (2006); Padulla; Alves (2009).

Los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* evaluados en el presente estudio presentaron diferencias en su patogenicidad en ninfas y adultos de *D. citri* en condiciones de laboratorio y en adultos de *D. citri* sobre las plántulas de *M. paniculata*. Para *B. bassiana* bajo condiciones de laboratorio la mortalidad en ninfas de *D. citri*, osciló entre 76,57 y 94,6%, destacándose la cepa CQ Caney 1 como la más patogénica, la mortalidad en adultos de *D. citri* varió entre 70,31 y 81,3%, siendo la cepa CV Tres Esquinas la de mayor patogenicidad para las dos localidades y la mortalidad de adultos de *D. citri* sobre plántulas de *M. paniculata* osciló entre 19,18% (cepa CQ Caney 3) y 28,66% (cepa CQ La Primavera).

Para el hongo *M. anisopliae* bajo condiciones de laboratorio, la mortalidad en ninfas de *D. citri* osciló entre el 84,03 y 93,75% y en adultos entre 76,6 y 82,0%, destacandose la cepa CV Primavera 2 como la más patogénica en los dos estados de desarrollo del insecto, en las dos localidades. La mortalidad de adultos sobre plántulas de *M. paniculata* varió entre 22,39% (cepa CV Primavera 2) y 23,56% (cepa CV Castillo) en las dos localidades.

Al respecto Orozco (2011) menciona que la patogenicidad está claramente relacionada con las cepas aisladas, ya que no todas poseen la misma capacidad de llevar a cabo su ciclo infeccioso en un mismo hospedero, generando diferentes niveles de mortalidad e incluso disminuyendo su tiempo acción. El grado de patogenicidad de los hongos entomopatógenos puede variar de acuerdo con el sustrato de procedencia, su nicho ecológico y sus condiciones fisiológicas y metabólicas (Hajek; St. Leger 1994).

Padulla; Alves (2009) en su investigación sobre la susceptibilidad de ninfas de *D. citri* a hongos entomopatógenos, encontraron diferencias con respecto a la patogenicidad entre aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, destacando que estas diferencias pueden estar relacionadas con la virulencia, especificidad y tolerancia del hospedero (Alves; Leucona 1998; Vestergaard et al., 1995) y en consecuencia, la producción de metabolitos secundarios que influyen la capacidad del patógeno para causar la enfermedad. Además de las cualidades intrínsecas de la sensibilidad de los patógenos y/o la resistencia natural del insecto hospedero es otro factor a ser considerado en la patogenicidad de un aislado (Alves, 1998).

### **Susceptibilidad de *Diaphorina citri* a *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana***

Las pruebas de patogenicidad realizadas sobre ninfas de *D. citri* en condiciones de laboratorio y adultos sobre plántulas de *M. paniculata* mostraron que los insectos de *D. citri* del Valle del Cauca fueron más susceptibles al ataque de hongos entomopatógenos que las ninfas en condiciones de laboratorio y los adultos sobre plántulas de *M. paniculata* del Quindío. Estas diferencias pueden estar sujetas a la variabilidad genética de las poblaciones de *D. citri* (Moncayo et al., 2013) y a las condiciones ambientales de cada una de las zonas. (García Pérez, 2013). Sin embargo, la mortalidad de los adultos de *D. citri* en condiciones de laboratorio del Quindío, fueron más susceptibles al ataque de los hongos que los insectos del Valle del Cauca. Esta situación puede deberse a la mortalidad elevada que se presentó en el testigo absoluto durante la realización del ensayo. También cabe destacar que no se presentaron diferencias entre las dos localidades bajo condiciones de laboratorio.

La variación en la susceptibilidad puede ser argumentada desde lo planteado por Moncayo et al., (2013) que afirma que los índices de diversidad genética encontrados en las poblaciones de *D. citri* fueron relativamente similares, indicando una separación reciente de las poblaciones del psílido asiático de los cítricos en las localidades del Valle del Cauca y Quindío, geográficamente similares y que los adultos de *D. citri* se encuentran en expansión, sin una diferenciación que conlleve a la generación de nuevos biotipos capaces de adaptarse a nuevos ambientes.

Las investigaciones realizadas por Moncayo et al., (2013) sobre la variabilidad genética de las poblaciones de *D. citri*, concluyeron que los insectos de la zona del Quindío

presenta mayor variabilidad genética intrapoblacional con relación a las poblaciones de *D. citri* en el Valle del Cauca. La variabilidad genética de poblaciones de las especies invasoras como *D. citri* es de gran importancia ya que permite entender la relación existente entre el insecto plaga y los agentes de control biológico, especialmente de hongos entomopatógenos (Hoy; Nguyen, 2000; Boykin et al., 2007).

La mayoría de los estudios de patogenicidad de hongos entomopatógenos de *D. citri* realizados hasta el momento, han sido adelantados en condiciones de laboratorio. Existe poca información sobre el uso de hongos entomopatógenos en el control de *D. citri* en campo. En la presente investigación se obtuvo una mortalidad de adultos de *D. citri* inferior al 30% sobre plántulas de *M. paniculata*. Las especies, *M. anisopliae*, *C. bassiana* e *I. fumosorosea*, disminuyeron en campo las poblaciones de adultos de *D. citri* de dos a un adulto por brote, después de 64 días de aplicación de los hongos (Lezama-Gutiérrez et al., 2012).

En el presente estudio la mortalidad de adultos sobre plántulas de *M. paniculata* fue baja (19.17%) frente a la obtenida en el laboratorio (42.67%); posiblemente debido a que durante la realización de los ensayos las condiciones climáticas fueron adversas para el desarrollo de los hongos, debido al fenómeno climático de El Niño. Las temperaturas máximas y mínimas encontradas durante la realización del ensayo de patogenicidad estuvieron en un promedio de 32 y 17°C y humedad relativa promedio de 70%, condiciones no apropiadas para el desarrollo de los hongos. Los factores más influyentes en la patogenicidad y desarrollo de los hongos entomopatógenos, así como en el desarrollo de la enfermedad son la temperatura y la humedad relativa (Hall, 1993); temperaturas entre los 20 y 30°C y humedad relativa cercana al 90% se consideran como las ideales para la germinación y esporulación de los hongos entomopatógenos (Tanada; Kaya, 1993).

Con relación a la mortalidad de ninfas Casique-Valdes (2011) reportan mortalidades de ninfas *D. citri* bajo condiciones de campo de 69.2, 46.7 y 45.7% con aplicaciones de los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea*, respectivamente, en un cultivo de naranja dulce en México.

Los resultados obtenidos en esta investigación brindan una herramienta para la implementación en el manejo de *D. citri* que permite incluir a los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* como microorganismos potenciales para reducir las poblaciones de ninfas y adultos de *D. citri* en cultivos de cítricos. Sin embargo, se requiere una selección más cuidadosa de las cepas promisorias.

Por ejemplo los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* asperjados sobre ninfas y adultos de *D. citri* bajo condiciones de laboratorio en un ambiente húmedo presentaron signos de esporulación, mientras que sobre las plántulas de *M. paniculata* los aislamientos no presentaron esporulación en los adultos muertos. Posiblemente la esporulación sobre ninfas y adultos en el laboratorio se deba a que se generó un ambiente húmedo dentro del recipiente que favoreció el desarrollo del hongo y aceleró el proceso de esporulación en las ninfas y adultos (Rath, 2000), aunque la esporulación es un factor importante puede ser no determinante para la penetración e infección del entomopatógeno (Lecuona et al., 2001).

No siempre la muerte de los insectos por hongos entomopatógenos presenta esporulación según lo reportado por Padulla (2007) quien obtuvo mortalidades de 72,94 y 61,04% sobre ninfas de *D. citri* después de haber sido asperjadas con el hongo *B. bassiana* y estas no presentaron signos de esporulación después de someter los cadáveres en cámara húmeda. Godoy et al., (2007) afirman que la esporulación del hongo *B. bassiana* depende de varios factores como: la calidad del aislamiento, el sustrato y las condiciones ambientales como temperatura y humedad relativa.

En Colombia se destaca el trabajo realizado por CORPIOCA (2014) y presentado como ponencia en el congreso cítrico en la ciudad de Medellín “Estrategias de control biológico para el manejo de *Diaphorina citri* en las condiciones colombianas”, donde se publicaron los resultados de la mortalidades de adultos de *D. citri* que oscilaron 13,33 y 100% bajo condiciones de laboratorio, con el uso de los hongos entomopatógenos de los géneros *Paecilomyces* sp., y *Beauveria* sp., respectivamente. Resultados similares a los encontrados en esta investigación con mortalidades que oscilaron entre 69.3 y 84.6%.

La búsqueda de nuevas cepas de hongos entomopatógenos con alta especificidad al psilido asiático de los cítricos, así como el estudio de la patogenicidad en campo y la compatibilidad de éstos con otros métodos de control merecen ser abordados para ampliar el conocimiento sobre la diversidad de las cepas y así poder encontrar organismos eficientes como agentes de control biológico.

En síntesis en esta tesis todas las cepas de hongos entomopatógenos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* obtenidos, fueron patogénicos a ninfas y adultos de *D. citri*. Se destacan las cepas CQCaney 1 (*B. bassiana*) y CV Primavera 2 (*M. anisopliae*), por su alta mortalidad de ninfas y adultos de *D. citri* en las localidades de Valle del Cauca y Quindío en condiciones de laboratorio. Para la mortalidad de adultos de *D. citri* sobre plántulas de *M. paniculata*, aunque la mortalidad obtenida fue menor con relación a la obtenida en laboratorio, se destaca la cepa CV La Unión (*B. bassiana*) que causó la mayor mortalidad. Se espera que estos aislamientos puedan ser estudiados más ampliamente e incluidos en un futuro como agentes de control en programas de manejo integrado del psilido asiático de los cítricos.

## 3. Conclusiones y Recomendaciones

### 3.1 Conclusiones

- Las especies de hongos identificados molecularmente con la secuenciación de la región ITS del ADNr corresponden a *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.
- El psilido asiático de los cítricos es susceptible a los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.
- En el análisis filogenético se observó una escasa diversidad genética (2%) entre las cepas de *B. bassiana*, sin embargo las cepas de *M. anisopliae* presentaron variabilidad genética (coeficiente de similitud 0.5) y se observó la formación de dos grupos distantes genéticamente.
- Las cepas CQ Caney 1 (*B. bassiana*) y CV Primavera 2 (*M. anisopliae*) se consideran como promisorias por su alta patogenicidad en ninfas y adultos de *D. citri*, en condiciones de laboratorio.
- La cepa CV La Unión (*B. bassiana*) presentó el mayor porcentaje de mortalidad (28, 66%) de adultos de *D. citri* en las dos localidades sobre plántulas de *M. paniculata*.
- Los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* fueron más patogénicos para el control de ninfas que adultos de *D. citri* en condiciones de laboratorio.

## 3.2 Recomendaciones

- Establecer pruebas de patogenicidad en campo que permitan evaluar la mortalidad causada por los hongos entomopatógenos encontrados en la presente investigación para el control de *D. citri*.
- Complementar el análisis filogenético, realizando amplificaciones de otras regiones genómicas.

## A. Anexo: Fincas muestreadas en el departamento del Quindío. 2013

MUNICIPIO	FINCA	GEOREFERENCIACIÓN			ÁREA Ha.	ESPECIE
		N	W	A		
Armenia	El Caney	4,45645	-75,72088	1302	9	Mandarina Oneco
Armenia	San Fernando	4,49424	-75,71344	1328	1	Mandarina Arrayana
Armenia	Hostal La Mia	4,48598	-75,70371	1358	1,3	Mandarina Oneco
Armenia	La Marsellesa	4,48786	-75,75450	1217	2	Naranja Valencia
Armenia	La Tesalia	4,48174	-75,72756	1291	0,64	Mandarina Oneco
Armenia	La Palma	4,48561	-75,71508	1274	3,5	Naranja Valencia
Armenia	Marmato	4,48724	-75,71862	1419	4	Naranja Sweety
Armenia	Corea	4,48562	-75,71507	1278	6,4	Naranja Sweety
Armenia	Primavera	448786	-7575450	1217	3	Naranja Sweety
Buenavista	Paraguay	4,39194	-75,7932	1219	30	Mandarina Oneco
Buenavista	San José	4,37313	-75,74208	1256	25,6	Naranja Sweety
Buenavista	Menadel	4,36629	-75,75459	1258	12	Naranja Sweety
Buenavista	Paraguaicito	4,39290	-75,74065	1206	27	Naranja oneco-Arrayana
Buenavista	Villa Julián	4,34407	-75,74927	1675	1	Mandarina Oneco
Calarcá	La Palma	4,43604	-75,70851	1285	110	Naranja sweety
Calarcá	Santa Lucia	4,43647	-75,71405	1305	30	Naranja hambly
Montenegro	La Esmeralda	4,45510	-75,83408	1165	5,12	Mandarina Oneco
Montenegro	La Cabaña	4,51546	-75,84201	1233	2	Mandarina Arrayana
Montenegro	La Cabañita	4,51493	-75,04298	1220	1	Naranja Sweety
Montenegro	Egipto	4,50404	-75,84661	1214	6,4	Naranja Sweety
Montenegro	El Progreso	4,5005	-75,86175	1206	39	Naranja Sweety
Montenegro	Bonaza	4,83664	-75,46182	1234	15	Naranja Sweety
Montenegro	Jazmín	4,5613	-75,81009	1227	5,76	Limón Tahití
Montenegro	Villa María	4,55588	75,78452	1285	0,5	Mandarina Oneco
Quimbaya	Granito De Oro	4,64190	-75,79877	1224	1	Naranja Sweety
Quimbaya	Agrícola La Tebaida	4,64970	-75,79467	1252	2	Limón Tahití
Quimbaya	Tierra Laurantia	4,65062	-75,80548	1219	0,32	Naranja Sweety
Quimbaya	Santa Elena	4,58699	-75,78026	1291	1,4	Mandarina Oneco
Quimbaya	Morena Clara	4,57393	-75,77609	1240	3	Naranja Sweety
Quimbaya	Hacienda La Tigrera	4,59544	-75,81994	1229	4	Mandarina Arrayana
Quimbaya	Villa Amanda	4,60679	-75,79086	1268	2	Mandarina Arrayana
Quimbaya	Santuario	4,64656	-75,80862	1229	0,5	Naranja Valencia-oneco
Tebaida	El Jardín del Edén	4,45468	-75,83466	1207	0,64	Naranja Valencia
Tebaida	Villa Rita	4,44536	-75,83183	1221	0,64	Mandarina Oneco
Tebaida	El Topacio	4,46629	-75,77646	1230	2	Naranja Sweety
Tebaida	Villa Mónica	4,43729	-75,33198	1195	2	Mandarina Oneco



## B. Anexo: Fincas muestreadas en el departamento del Valle del Cauca. 2013

MUNICIPIO	FINCA	GEOREFERENCIACIÓN			ÁREA Ha.	ESPECIE
		N	W	A		
Alcalá	La Bella	4,66545	-75,78188	1267	0,5	Naranja Sweety
Alcalá	Santa Cruz	4,66278	-75,8055	1220	60	Naranja Sweety
Alcalá	Santa Cruz 2	4,66107	-75,8018	1229	4,2	Naranja Sweety
Alcalá	Villa Karina	4,66448	-75,78023	1263	0,5	Naranja Valencia
Alcalá	El Porvenir	4,6826	-75,79163	1238	11	Naranja Valencia
Alcalá	El Caney	4,68580	-75,81373	1229	7,7	Naranja Valencia
Alcalá	La Playa	4,69397	-75,82225	1222	115,2	Naranja Sweety
Alcalá	El Edén	4,466889	-75,75268	1346	18	Naranja Valencia
Bugalagrande	La Carrilera	4,11262	-7610105	976	0.2	Limón Pajarito
Caicedonia	El Jardín	4,32560	-75,82265	1208	7,5	Mandarina Oneco
Caicedonia	La Cristalina	4,32560	-75,82265	1208	2,5	Naranja Sweety
Caicedonia	San Jorge	4,32267	-75,83438	1229	27	Naranja Sweety
Caicedonia	La Cumbre	4,35824	-75,82693	1192	51,2	Naranja Sweety
Caicedonia	El Castillo	4,38499	-75,86302	1099	17	Naranja Sweety
Caicedonia	El Paraíso	4,32345	-75,80344	1203	45	Mandarina Arrayana
Caicedonia	Costa Rica	4,3299	-75,86670	1333	50	Mandarina Arrayana
Caicedonia	La Primavera	4,33600	-75,8120	1178	25	Naranja Sweety
La Victoria	El Porvenir	4,51337	-75,89315	1326	0,5	Mandarina Arrayana
La Victoria	la Cumbre	4,51497	-75,88997	1314	13	Mandarina Arrayana
La Victoria	Alto de la Virgen	4,51700	.75,91655	1423	2	Mandarina Arrayana
La Victoria	Las Galas	4,51946	.75,91703	1424	0,5	Naranja Sweety
La Victoria	Los Balcones	4,50640	-75,91762	1376	6,5	Mandarina Arrayana
La Victoria	Sultana	4,50788	-75,98188	957	0,5	Mandarina Arrayana
La Victoria	Los Domínguez	4,50722	-75,98411	969	0,64	Limón Pajarito
La Victoria	Rancho Santiago	4,49955	-75,98991	963	2,4	Limón Pajarito
Roldanillo	El Higuérón	4,266558	-76,81186	960	0.5	Naranja Sweety
Roldanillo	La Fanny	4,17709	-7612358	944	1	Mandarina Oneco
Sevilla	El Remanso	4,36879	-75,85938	1094	51	Naranja Sweety
Sevilla	Las Vegas	4,36197	-75,86382	1123	77	Mandarina Arrayana
Sevilla	La Maquita	4,38146	-75,86447	1120	47	Naranja Sweety
Sevilla	La Holanda	4,36939	-75,87407	1174	184	Mandarina Oneco
Sevilla	Palmichal	4,37152	-75,89568	1193	96,8	Naranja Sweety
Sevilla	Cristales	4,3998	-75,87758	1073	64	Naranja Sweety
Sevilla	Villa Sol	4,364886	-75,89933	1376	102	Mandarina Arrayana

86 Identificación de hongos entomopatógenos de *Diaphorina citri* Kuwayama, en los departamentos del Valle del Cauca y Quindío, Colombia

---

Sevilla	La Julia	4,39734	-75,93660	1269	28	Naranja Sweety
---------	----------	---------	-----------	------	----	----------------

---

## C. Anexo: Cercos muestreadas en el departamento del Valle del Cauca. 2013

MUNICIPIO	FINCA	GEOREFERENCIACIÓN			ÁREA Ha	ESPECIE
		N	W	A		
La Unión	San Luis	4,331422	-7652557	958	0.1	Mirto
La Unión	Casco urbano	4,326065	-7655815	957	0.1	Mirto
Tuluá	Tres Esquinas	4.75740	-76.13142	959	0.1	Mirto
Roldanillo	El Higuero	4,266558	-76,81186	960	0.2	Mirto

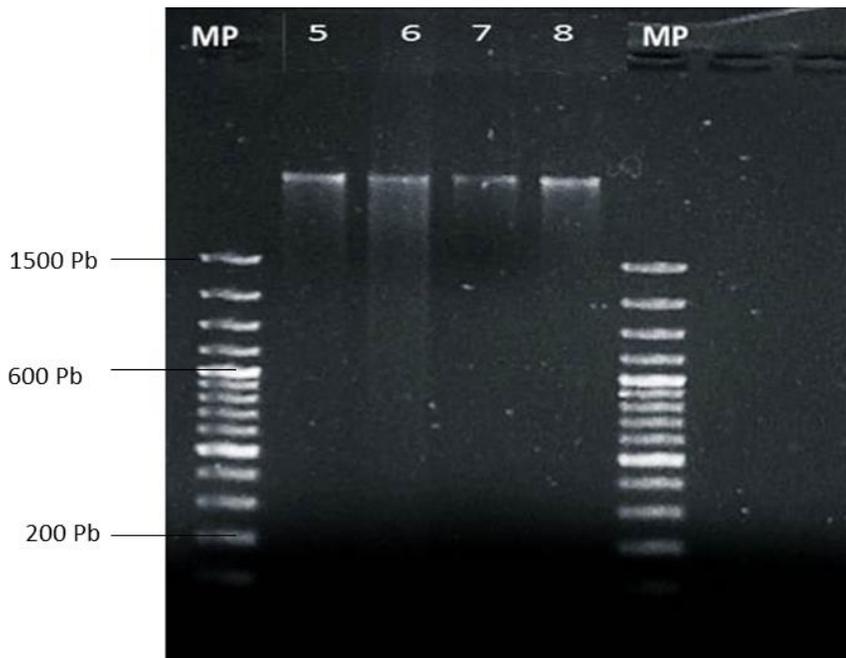


**D. Anexo: Descripción y georreferenciación de las fincas donde se colectaron insectos muertos de *D. citri*, en los departamentos de Valle del Cauca y Quindío. 2013**

MUNICIPIO	FINCA	GEOREFERNCIACIÓN			ESPECIE
		N	W	A	
Armenia	La Primavera	4.48786	-75.75450	1217	Naranja Sweety
Armenia	Caney 3	4.45645	-75.72088	1302	Mandarina Oneco
Armenia	Caney 1	4.45645	-75.72088	1302	Mandarina Oneco
Buenavista	Paraguaicito	4.39293	-75.74065	1206	Mandarina Oneco
Caicedonia	Primavera 2	4.33621	-75.81210	1178	Naranja Sweety
Caicedonia	El Castillo	4.38499	-75.86302	1099	Mandarina Oneco
La Unión	San Luis	4.33142	-76.52557	958	Mirto
Tuluá	Tres Esquinas	4.75740	-76.13142	959	Mirto

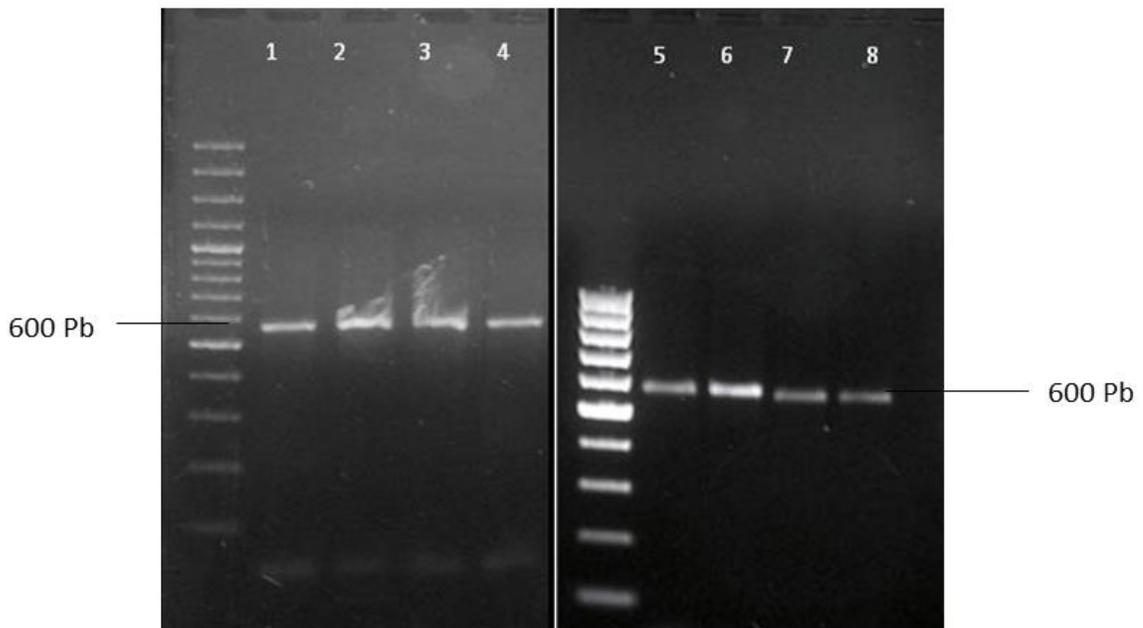


**E. Anexo: ADN total visualizado sobre gel de agarosa al 0.8%. Carril MP: marcador de peso molecular (100pb), carril 5-8 de ADN de las cepas 1. CQCaney1, 2. CQCaney 3, 3. CV Castillo 2 y 4. CV Primavera 1, aislados de adultos de *D. citri*.**





**F. Anexo: Visualización de la Amplificación por PCR con cebadores ITS 1e ITS 4, Sobre gel agarosa 1.2%, marcador de peso molecular (100pb) Labder, carril 1- 4, marcador de peso molecular (100pb) fermentas carril 5- 8: amplificados de la región ITS 1e ITS 4 de los hongos entomopatogenos aislados de adultos de *D. citri*.**





## G. Anexo: Secuencias editadas de los hongos *B.bassiana* y *M. anisopliae*

*Beauveria bassiana* Aislamiento CQ Caney1

ATTACTACGCAGAGGTCGCCGCGGACGGGCCCACTCCATTTAGGGCCGGCGGTGTGCT  
GCCGGTCCCCAACGCCGACCTCCCCAGGGGAGGTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAG  
GCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTTACTGGATT  
CTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATC  
CGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTGTTTTGCCTTGC GGCGTATT CAGAAGATGCTGGAATACA  
AGAGTTTGAGGTCCCCGGCGGGCCGCTGGTCCAGTCCGCGTCCGGGCTGGGGCGAGTCCG  
CCGAAGC

*Beauveria bassiana* Aislamiento CQ Caney3

TGGGTGTTTTACGGCGTGGCCGCGTCCGGGTTCCGGTTCGAGCTGTATTACTACGCAGAGG  
TCGCCGCGGACGGGGCCGCACTCCATTTAGGGCCGGCGGTGTGCTGCCGGTCCCCAACG  
CCGACCTCCCCAGGGGAGGTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGA  
ATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTTACTGGATTCTGCAATTCACATT  
ACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT  
TTGATTCATTTGTTTTGCCTTGC GGCGTATT CAGAAGATGCTGGAATACAAGAGTTTGAGGTC  
CCCGCGGGCCGCTGGTCCAGTCCGCGTCCGGGCTGGGGCGAGTCCGCCGA

*Beauveria bassiana* Aislamiento CQ La Primavera

GTT CAGAAGTTGGGTGTTTTACGGCGTGGCCGCGTCCGGGTTCCGGTTCGAGCTGTATTACT  
ACGCAGAGGTCGCCGCGGACGGGGCCGCACTCCATTTAGGGCCGGCGGTGTGCTGCCGG  
TCCCCAACGCCGACCTCCCCAGGGGAGGTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATG  
CCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTTACTGGATTCTGCA  
ATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGT  
TGAAAGTTTTGATTCATTTGTTTTGCCTTGC GGCGTATT CAGAAGATGCTGGAATACAAGAGTT  
TGAGGTCCCCGGCGGGCCGCTGGTCCAGTCCGCGTCCGGGCTGGGGCGAGTCCGCCGAAG  
CAACGATAGGTAGG

*Beauveria bassiana* Aislamiento CV La Union

GTGCGAGCTGTATTACTACGCAGAGGTCGCCGCGGACGGGGCCCACTCCATTTAGGGCC  
GGCGGTGTGCTGCCGGTCCCCAACGCCGACCTCCCCAGGGGAGGTTCGAGGGTTGAAATGA  
CGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGAT  
GATTTACTGGATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAG  
AGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTGTTTTGCCTTGC GGCGTATT CAGAAGA

TGCTGGAATACAAGAGTTTGAGGTCCCCGGCGGGCCGCTGGTCCAGTCCGCGTCCGGGCTG  
GGGCGAGTCCGCCAAGCAACGATAGGTAGGTTTAC

*Beauveria bassiana* Aislamiento CV Tres Esquinas

GAGGTCACGTTTCAGAAGTTGGGTGTTTTACGGCGTGGCCGCGTCCGGGTTCCGGTGCGAGC  
TGTATTACTACGCAGAGTTCGCCGCGGACGGGCGCCACTCCATTTAGGGCCGGCGGTGT  
GCTGCCGGTCCCAACGCCGACCTCCCCAGGGGAGGTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGAA  
CAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCAGT  
GATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGA  
GATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTGTTTTGCCTTGCGGCGTATTCAGAAGATGCTGGAA  
TACAAGAGTTTGAGGTCCCCGGCGGGCCGCTGGTCCAGTCCGCGTCCGGGCTGGGGCGAG  
TCCGCCGAAGCAACGATAG

*Metarhizium anisopliae* Aislamiento CQ Paraguacito

GGACCGCGCCGGGCTCCTGTTGCGAGTGTAAAACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAG  
ACCGCCAATTAATTTAAGGGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCA  
AGTCCACAGGGGACTTGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTG  
ACGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCAGTGAATTCGCAATTCACATTACTTATC  
GCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTC  
ATTTTTTAACCACTCAGAAGATACTTATTAATAAATTCAGAAGGTTCCGGTCCCCGGCGGGC  
GCGAAGTCCCGCCGAAGC

*Metarhizium anisopliae* Aislamiento CV El Castillo 1

TTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAATTTAAGGGACGGCTGTGC  
TGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACACCAAGTCCACAGGGGACTTGAGGGGCGTAATG  
ACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGACGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGAT  
GATTCAGTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAG  
AACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTAACCACTCAGAAGATACTTATTA  
AAAATTCAGAAGGTTCCGGTCCCCGGCGGGCGCAAGTCCCGCCGAAGCAACAATTAAG

*Metarhizium anisopliae* Aislamiento CV Primavera 2

AGGGATCATTACCGAGTTATCCAACCTCCAACCCCTGTGAATCATACCTTTAATTGTTGCTTCG  
GCGGGACTTCGCGCCCGCCGGGGACCCGAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGT  
GGTAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC  
GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC  
ACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACGCCCTCAAGT  
CCCCTGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGCCGTCCCTTAA  
TTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCAGTAGTAAACACTCGCAACAGGAGCC  
CGGCGCGGTCCACTG

## Bibliografía

Ahmad, K., Sijam, K., Habibuddin, H., Kadir, J., y Rastan, S. O. S. (2008). Occurrence and spread of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the causal agent of Huanglongbing disease of citrus in Malaysia. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4 (1), 103-111.

Agrios, G. N. (2005). Plant pathology (No. LC-0222). Elsevier academic press.

Alexopoulos, C.S. y Mins, C.W. (1979). Introductory Mycology, 3th.ed. New York, 416-429.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25 (17), 3389-3402.

Álvarez, F. J., Naranjo, M. F., y Grillo, H. (2003). Hongos entomopatógenos de *Diaphorina citri* Kirk. (Homoptera; Psyllidae) en Jovellanos, Matanzas. *Centro Agrícola*, 30 (2), 87.

Alves, S. B. (1998). Patología e controle microbiano: vantagens e desvantagens. *Controle microbiano de insetos*, 2, 21-37.

Alves, S., y Lecuona, R. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano. *ALVES, SB Controle Microbiano de Insetos*, 2.

Aricapa, M., y Correa, F. (1994). Almacenamiento de hongos en papel filtro. *Ascolfi Informa*, 20 (3), 29-30.

Ariza, N., Angel, J. y Giraldo, J. (2003). Caracterización molecular y análisis de la variabilidad genética de aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kuhn, en cultivos de papa de Cundinamarca y Nariño (No. Doc. 20402) CO-BAC, Bogotá.

Atwal, A. S., Chaudhary, J. P., y Ramzan, M. (1970). Studies on the development and field population of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayana (Psyllidae: Homoptera). *Journal of Research-Punjab Agricultural University*, 7 (3), 333-338.

Aubert, B. (1987). *Trioza erytrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. *Fruits*, 42 (3), 149-162.

Aubert, B., Bové, J. M., y Etienne, J. (1980). La lutte contre la maladie du greening des agrumes à l'île de la Réunion. Résultats et perspectives. *Fruits*, 35 (10), 605-624.

Ayra, L., Cabrera, I., Gómez, M., y Hernández, D. (2001). Empleo de marcadores bioquímicos y de DNA en la caracterización molecular de hongos entomopatógenos. *Dpto. de ácaros y hongos entomopatógenos, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT). Habana.*

Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S., y Donoghue, M. J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 247-277.

Baños, H. L., Miranda, I., y Martínez, M. (2013). Biology and life table of *Tamarixia radiata* Waterston under controlled conditions. *Revista de Protección Vegetal*, 28 (2), 120-126.

Barnett, H. L., y B. B. Hunter. (1987). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 4th Edition, Macmillan Company, New York.

Barron, G. (2001). George Barrons Website on Fungi. Universidad de Guelph, Ontario, Canadá. Consultado 27 noviembre 2005. Disponible en: <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm>

Bartnicki-Garcia, S. (1983). Spore germination in fungi: Basic concepts. Roberts, D; Aist J (Eds) Infection Proceses of Fungi. A Bellagio Conference (21-25 Marzo: New York). The Rockefeller Foundation, 111-117.

Becerra, V., Paredes, M., Rojo, C., y France, A. (2007). RAPD e ITS Detectan Variación Molecular en Poblaciones Chilenas de *Beauveria bassiana*. *Agricultura Técnica*, 67 (2), 115-125.

Bedford, I. D., Kelly, A., Banks, G. K., Fuog, D., y Markham, P. G. (1998). The effect of pymetrozine, a feeding inhibitor of Homoptera, in preventing transmission of cauliflower mosaic caulimovirus by the aphid species *Myzus persicae* (Sulzer). *Annals of Applied Biology*, 132 (3), 453-462.

Benham, R. W., y Miranda, J. L. (1953). The genus *Beauveria*, morphological and taxonomical studies of several species and of two strains isolated from wharf-piling borers. *Mycologia*, 727-746.

Berg, M. (1999). Measures to reduce citrus psilla populations and the spread of greening disease. *Neltropika Bolletin*, 303, 5-6.

Boina, D. R., Meyer, W. L., Onagbola, E. O., y Stelinski, L. L. (2009). Quantifying dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) by immunomarking and potential impact of unmanaged groves on commercial citrus management. *Environmental Entomology*, 38 (4), 1250-1258.

Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 7-37.

Boykin, L. M., Bagnall, R. A., Frohlich, D. R., Hall, D. G., Hunter, W. B., Katsar, C. S., ... y Rosell, R. C. (2007). Twelve polymorphic microsatellite loci from the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, the vector for citrus greening disease, huanglongbing. *Molecular Ecology Notes*, 7 (6), 1202-1204.

Brlansky, R. H., y Rogers, M. E. (2007). Citrus huanglongbing: Understanding the vector-pathogen interaction for disease management. *APS net Features*.

Brlansky, R. H., Dewdney, M. M., y Rogers, M. E. (2010). Florida Citrus Pest Management Guide: Huanglongbing (Citrus Greening). Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.

Bruns, T. D., Vilgalys, R., Barns, S. M., Gonzalez, D., Hibbett, D. S., Lane, D. J., ... y Sogin, M. L. (1992). Evolutionary relationships within the fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1 (3), 231-241.

Bull, A. T., Ward, A. C., y Goodfellow, M. (2000). Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (3), 573-606.

Cabrera, I., González, C., Hernández, D., y Tapia, J. L. (2002). Presencia del hongo *Hirsutella citriformis* Speare sobre *Diaphorina citri* Kuw. (Homoptera: Psyllidae) en cítricos de Cuba. *Revista de Protección Vegetal*.

Cañedo, V., y Ames, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos patógenos Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima-Perú

Capoor, S. P., Rao, D. G., y Viswanath, S. M. (1974). Greening disease of citrus in the Deccan Trap Country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. *Proceedings of 6th Conference of International Organization of Citrus Virologists*, 21-28 August 1972, 43-49.

Crdenas, J. C. G., Castellanos, S. I. E., Fucikovskiy, Z. J., López, H. M., Sánchez, R. G., y Elorza, M. P. (2008). Dinámica de población y tasa de infección de *Diaphorina citri* al hongo *Hirsutella citriformis* en *Citrus sinensis* en Tuxpan. *Veracruz, México*.

Carreño, I. A. (2003). Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. *Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá, Colombia*.

Casique Valdes, R. (2011). Evaluación de hongos entomopatógenos y sus formulaciones contra el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* (Kuwayama). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Dirección de Posgrados-Parasitología, Buenavista, Mexico.

Castaño-Zapata, J. (1994). Hongos fitopatógenos. En Principios básicos de fitopatología. Segunda edición. Tegucigalpa, Honduras: *Escuela Agrícola Panamericana*, 552.

Charnley, A. K., y Collins, S. A. (2007). Entomopathogenic Fungi and Their Role in Pest Control. Kubicek C. P., Drzhinina I. S. (Eds): *Environmental and Microbial Relationships*, 2nd Edition The Mycota IV. Berlin. Heidelberg. Springer-Verlag. 4, 159.

Chien, C. C. (1995). The role of parasitoids in the pest management of citrus psyllid. In *Proceedings of the Symposium on Research and Development of Citrus in Taiwan, Taichung, Taiwan*, 245-261.

Chien, C. C., Chiu, S. C., y Ku, S. C. (1989). Biological control of *Diaphorina citri* in Taiwan. *Fruits*, 44 (7-8), 401-407.

Coates, B. S., Hellmich, R. L., y Lewis, L. C. (2002). Allelic variation of a *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) minisatellite is independent of host range and geographic origin. *Genome*, 45 (1), 125-132.

Cocco, A., y Hoy, M. A. (2008). Toxicity of organosilicone adjuvants and selected pesticides to the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) and its parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). *Florida Entomologist*, 91 (4), 610-620.

Conceschi, M. R. (2013). Potencialidade dos fungos entomopatogênicos *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana* para o controle de pragas dos citros (Doctoral dissertation, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"). São Paulo, Brasil.

CORPOICA. (2014). Estrategias de control biológico para el manejo de *D. citri* en las condiciones colombianas. En: Congreso cítrico. Disponible: <http://congresocitricos.com/wp-content/uploads/2014/12/Juan-Humberto-Guar%C3%ADn-Molina-Estrategia-de-control-Biol%C3%B3gico-para-el-manejo-de-Diaphorina-citri-en-las-condiciones-Colombianas.pdf>

Costa, N., y Concordia, I. E. (2005). Nueva enfermedad pone en riesgo a la citricultura argentina. Disponible en: <http://www.asaprove.org.ar>.

Cruz, L. P., Gaitan, A. L., y Gongora, C. E. (2006). Exploiting the genetic diversity of *Beauveria bassiana* for improving the biological control of the coffee berry borer through the use of strain mixtures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71 (6), 918-926.

Darderes, C. S. G (2009). *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), vector de la bacteria que causa el Huanglongbing (HLB–Greening). *Buenos Aires (Argentina): Ministerio de la Producción, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria*. Disponible en: <https://sites.google.com/site/diaphorina/diaphorina>

Devine, G. J., Eza, D., Ogasuku, E., y Furlong, M. J. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25 (1), 74-100.

Driver, F., Milner, R. J., y Trueman, J. W. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104 (02), 134-150.

Ebratt-Ravelo, E. E. (2009). Seminario de investigación “Hacia la implementación de un programa de certificación de cítricos para Colombia”. *Diaphorina citri* kuwayama (Hemiptera: Sternorrhyncha: Psyllidae): nuevo insecto plaga en la producción de cítricos en Colombia. 2009. Disponible en:  
[http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Epidemiologia-Agricola/BOLETINES/Nacionales/2010/BN\\_Diaphorina\\_2010.aspx](http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Epidemiologia-Agricola/BOLETINES/Nacionales/2010/BN_Diaphorina_2010.aspx)

Ebratt-Ravelo, E. E., Rubio-González, L. T., Costa, V. A., Castro-Ávila, Á. P., Zambrano-Gómez, E. M., y Ángel-Díaz, J. E. (2011). *Diaphorina citri* (Kuwayama, 1907) and *Tamarixia radiata* (Waterson, 1922) in citrus crops of Cundinamarca, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 29 (3), 487-493.

Etienne, J., Quilici, S., Marival, D., y Franck, A. (2001). Contrôle biologique de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) en Guadeloupe par importation de *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). *Fruits Journal* 56 (5), 307-315.

Fargues, J. (1984). Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity. En: D. W. Roberts and J. R. Aist (ed.), *Infection processes of fungi*. Rockefeller Foundation Conference Reports, New York, N.Y., 90–110.

Fegan, M., Manners, J. M., Maclean, D. J., Irwin, J. A. G., Samuels, K. D. Z., Holdom, D. G., y Li, D. P. (1993). Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Microbiology*, 139 (9), 2075-2081.

Fernández, M., y Miranda, I. (2005). *Comportamiento de Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Parte III: Relación entre el ciclo de vida y el brote vegetativo foliar*. *Revista de Protección Vegetal* (2132).

Ferreira, A., Alves, G., Postalia, J. y Takao, Y. P. (2013). Uso de *Tamarixia Radiata* para el control biológico de *Diaphorina.citri*. Departamento de entomología y acarología. Taller Subregional de Control Biológico de *Diaphorina citri*, vector del HLB de Mexico, 41-47.

Ferron, P. (1978). Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*, 23 (1), 409-442.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. (2009). Manual de greening. Araraquara: FUNDECITRUS, 12.

Galán Franco, L. (2012). Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos de las diferentes zonas citrícolas de México. (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León), Mexico.

Gandarilla Pacheco, F. L. (2012). Evaluación de aislados nativos de hongos entomopatógenos de zonas citrícolas sobre *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León). Mexico.

Gandarilla-Pacheco, F. L., López-Arroyo, J. I., Galán-Wong, L. J., y Quintero-Zapata, I. (2013). Pathogenicity of native entomopathogenic fungi from the Mexican citrus-growing area against *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *Southwestern Entomologist*, 38 (2), 325-338.

Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y., ... y Peng, G. (2011). Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium acridum*. *Plos Genet*, 7 (1), e1001264.

García Pérez, F. (2013). Caracterización morfométrica y genética de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) de rutáceas en Cazones, Veracruz, México.

Garnier, M., Jagoueix-Eveillard, S., Cronje, P. R., Le Roux, H. F., y Bové, J. M. (2000). Genomic characterization of a Liberibacter present in an ornamental rutaceous tree,

*Calodendrum capense*, in the Western Cape Province of South Africa. Proposal of *Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 (6), 2119-2125.

Ghikas, D. V., Kouvelis, V. N., y Typas, M. A. (2010). Phylogenetic and biogeographic implications inferred by mitochondrial intergenic region analyses and ITS1-5.8 S-ITS2 of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *BMC Microbiology*, 10 (1), 1.

Gindin, G., Glazer, I., Mishoutchenko, A., y Samish, M. (2009). Entomopathogenic fungi as a potential control agent against the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* in broiler houses. *Biocontrol*, 54 (4), 549-558.

Glare, T. R. (1992). Fungal pathogens of scarabs. *Use of pathogens in scarab pest management/edited by Trevor A. Jackson and Travis R. Glare*, 63-77.

Godoy, J., Valera, R., Guédez, C., Cañizales, L., y Castillo, C. (2007). Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 24 (3).

González, C., Hernández, D., Cabrera, R. I., y Tapia, J. R. (2005). *Diaphorina citri* Kuw., inventario y comportamiento de los enemigos naturales en la citricultura cubana. *Food and Agriculture Organization of Cuba*, 11.

Gottwald, T. R., da Graça, J. V., y Bassanezi, R. B. (2007). Citrus Huanglongbing: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, 6.

Gouli, S., Gouli, V., Skinner, M., Parker, B., Marcelino, J., y Shternshis, M. (2008). Mortality of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, under influence of single and mixed fungal inoculations. *Journal of Agricultural Technology*, 4 (2), 37-47.

Graca, J. D. (1991). Citrus greening disease. *Annual Review of Phytopathology*, 29 (1), 109-136.

Graham, M. D. V. (1991). A reclassification of the European Tetrastichinae (Hymenoptera: Eulophidae): revision of the remaining genera. *Memoirs of the American Entomological Institute (USA)*.

Guarin, J. H. (2007). Efeito do controle microbiano em insetos sugadores em três sistemas de manejo de pragas de citros (Doctoral dissertation, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"). Brasil.

Hajek, A. E.; St. Leger, R. J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual review of entomology*, 39 (1), 293-322.

Halbert, S. E., y Manjunath, K. L. (2004). Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist*, 87 (3), 330-353.

Hall, D. G. (2008). Biological control of *Diaphorina citri*. Resúmenes del primer taller internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus Liberibacter* spp.) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*).

Hall, R. A. (1981). fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. *Microbial control of pests and plant diseases*, 1970-1980.

Hall, R. A. (1993). The use of pathogens to control whiteflies in Europe and the Tropics: Possibilities for Integrated Control. Memoria II Taller Latinoamericano y del Caribe sobre moscas blancas y geminivirus. Managua, Nicaragua, 20-22.

Hall, D. G., Hentz, M. G., Meyer, J. M., Kriss, A. B., Gottwald, T. R., y Boucias, D. G. (2012). Observations on the entomopathogenic fungus *Hirsutella citriformis* attacking adult *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in a managed citrus grove. *BioControl*, 57 (5), 663-675.

Hansen, A. K., Trumble, J. T., Stouthamer, R., y Paine, T. D. (2008). A new huanglongbing species, *Candidatus Liberibacter psyllae*, found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Applied and environmental microbiology*, 74 (18), 5862-5865.

Hegedus, D. D., y Khachatourians, G. G. (1995). The impact of biotechnology on hypomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology advances*, 13 (3), 455-490.

Hegedus, D. D., Pfeifer, T. A., Mulyk, D. S., y Khachatourians, G. G. (1998). Characterization and structure of the mitochondrial small rRNA gene of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Genome*, 41 (3), 471-476.

Henson, J. M., y French, R. C. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Papers in Plant Pathology*, 2.

Hernández-Fuentes, L. M., Urias-López, M. A., López-Arroyo, J. I., Gómez-Jaimes, R., y Bautista-Martínez, N. (2012). Control químico de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en lima persa *Citrus latifolia* Tanaka. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3 (3), 427-439.

Hoy, M. A., y Nguyen, R. (2000). Classical biological control of Asian citrus psylla. *Citrus Industry*, 81, 48-50.

Hoy, M. A., Nguyen, R., y Jeyaprakash, A. (2004). Classical biological control of Asian citrus psyllid in Florida. *Integrated Pest management Florida, University of Florida*, Disponible:<http://ipm.ifas.ufl.edu/agriculture/citrus/psyllid.shtml>

Humber, R. A. (2012). Phylogenetic reclassification raises new respect—and a new phylum – for Entomophthorales. *Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology*, 106.

Hung, T. H., Hung, S. C., Chen, C. N., Hsu, M. H., y Su, H. J. (2004). Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector–pathogen relationships. *Plant Pathology*, 53 (1), 96-102.

INISAV (Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, CU). (1999). Analítico: enfermedad del enverdecimiento de los cítricos y su vector (*Diaphorina citri* knwayama). *Boletín Técnico*.

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. (2014). Vigilancia del Huanglongbing (HLB) de los cítricos y su vector el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en Colombia. Boletín Epidemiológico. Disponible en: [http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Epidemiologia-Agricola/HUANGLONGBING/BOL\\_HLB\\_2012\\_2014.aspx](http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Epidemiologia-Agricola/HUANGLONGBING/BOL_HLB_2012_2014.aspx)

----. (2014). El ICA junto con ARS-USDA y la Universidad de California en Riverside, detecta nueva especie de bacteria en cítricos [en línea]: documento electrónico 2014 [fecha de consulta: 4 de diciembre 2014]. Disponible en: [http://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2013-\(1\)/El-ICA-junto-con-ARS-USDA-y-la-Universidad-de-Cali.aspx](http://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2013-(1)/El-ICA-junto-con-ARS-USDA-y-la-Universidad-de-Cali.aspx)

----. Gerencia General (2015). Resolución ICA 2390. Por medio de la cual se declara el estado de emergencia fitosanitaria en el territorio nacional por la presencia de adultos de *Diaphorina citri* infectados con la bacteria del HLB de los cítricos [en línea]: documento electrónico 2015 [fecha de consulta: 22 de diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.ica.gov.co/getattachment/814e6823-aa26-49ee-a2c0-a814e2e61967/2015R2390.aspx>

----. (2015). Bioinsumos registrados en Colombia [en línea]: documento electrónico 2014 [fecha de consulta: 05 septiembre 2015]. Disponible en:

<http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Fertilizantes-y-Bio-insumos-Agricolas/Listado-de-Bioinsumos/2009/PRODUCTOS-BIOINSUMOS-MAYO-13-DE-2008.aspx>

----- Gerencia Seccional Guajira (2016). Resolución ICA 4713. Por medio de la cual se declara en cuarentena fitosanitaria el departamento de la Guajira, por la presencia de la plaga denominada Huanglongbing (HLB) de los cítricos [en línea]: documento electrónico 2016 [fecha de consulta: 20 de junio 2016]. Disponible en:

<http://www.ica.gov.co/getattachment/3774bbb3-46a3-41a7-af14-3863c470ba8d/2016R4713.aspx>

Inoue, H., Ohnishi, J., Ito, T., Tomimura, K., Miyata, S., Iwanami, T., y Ashihara, W. (2009). Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. *Annals of Applied Biology*, 155 (1), 29-36.

Irey, M. S., Gast, T., y Gottwald, T. R. (2006). Comparison of visual assessment and polymerase chain reaction assay testing to estimate the incidence of the Huanglongbing pathogen in commercial Florida citrus. In *Proceeding. Florida. State Horticultural. Society*, 119, 89-93.

Iturralde, M. J., Ballesteros, S., y Ramón, F. (2002). Retos en el diagnóstico de las intoxicaciones por setas. *Rev Tóxica*, 19, 97-144. Disponible en: <http://rev.aetox.es/wp/wp-content/uploads/hemeroteca/vol19-3/revtox.19.3.2002.pdf>

Jackson, M. A., Dunlap, C. A., y Jaronski, S. T. (2010). Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. In *The Ecology of Fungal Entomopathogens*, 129-145.

Jagoueix, S., Bove, J. M., y Garnier, M. (1994). The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the  $\alpha$  subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44 (3), 379-386.

----- (1996). PCR detection of the two *Candidatus Liberobacter* species associated with greening disease of citrus. *Molecular and cellular probes*, 10 (1), 43-50.

James, R. R., Buckner, J. S., y Freeman, T. P. (2003). Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84 (2), 67-74.

King, C. W. H., Gómez, C. E., Ebrath, E. E., Ramos, A. A., Burckhardt, D., Moreno, H. y Castañeda, A. (2008). Detección de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) asociados en cítricos en Colombia. En: XXXV Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología.

Kistler, H. C., Bosland, P. W., Benny, U., Leong, S., y Williams, P. H. (1987). Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. *Phytopathology*, 77 (9), 1289-1293.

Klassen, G. R., McNabb, S. A., y Dick, M. W. (1987). Comparison of physical maps of ribosomal DNA repeating units in *Pythium*, *Phytophthora* and *Apodachlya*. *Journal of General Microbiology*, 133 (10), 2953-2959.

Kondo, T., Quintero, Q., Campuzano, M., Wyckhuys, K. A. G., y Heraty, J. (2012). First report of *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) in the Department of Valle Del Cauca, Colombia. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*, 13 (1), 48-51.

Lacey, L. A. (1997). *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press.

Lagos, G. A. (2007). Evaluación de ocho cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* (metsh.) Sorokin, para el control de *Aleurothrixus floccosus* Maskell.

- Leal, R. M. (2009). Distribuição espacial de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) e sua relação com a expansão do greening em laranjeira Valência, utilizando geoestatística.
- Lecuona, R. E., Edelstein, J. D., Berretta, M. F., La Rossa, F. R., y Arcas, J. A. (2001). Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) strains as potential agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*, 38 (2), 172-179.
- León, G. A. (2015). Huanglongbing y Leprosis, enfermedades de importancia económica y cuarentenaria para el cultivo de los cítricos en Latinoamérica. *VII Congreso Latinoamericano de Agronomía, Guayaquil*.
- Lezama-Gutiérrez, R., Molina-Ochoa, J., Chávez-Flores, O., Ángel-Sahagún, C. A., Skoda, S. R., Reyes-Martínez, G., ... y Foster, J. E. (2012). Use of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* and *Isaria fumosorosea* to control *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Persian lime under field conditions. *International Journal of Tropical Insect Science*, 32 (01), 39-44.
- Liefting, L. W., Sutherland, P. W., Ward, L. I., Paice, K. L., Weir, B. S., y Clover, G. R. (2009). A new *Candidatus Liberibacter* species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Disease*, 93 (3), 208-214.
- Liu, T. X. (2003). Effects of a juvenile hormone analog, pyriproxyfen, on *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). *Pest Management Science*, 59 (8), 904-912.
- Liu, H., Skinner, M., Brownbridge, M., y Parker, B. L. (2003). Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 82 (3), 139-147.

Liu, B. L., y Tzeng, Y. M. (2012). Development and applications of destruxins: A review. *Biotechnology Advances*, 30 (6), 1242-1254.

Liu, Z. L., y Sinclair, J. B. (1992). Genetic Diversity of *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group 2. *Phytopathology*, 82 (7), 778-787.

Liu, W. Z., Boucias, D. G., y McCoy, C. W. (1995). Extraction and characterization of the insecticidal toxin hirsutellin A produced by *Hirsutella thompsonii* var. thompsonii. *Experimental Mycology*, 19 (4), 254-262.

López, S. A., Bertolini, E., Frare, G. F., Martins, E. C., Wulff, N. A., Teixeira, D. C., ... y Cambra, M. (2009). Graft Transmission Efficiencies and Multiplication of *Candidatus Liberibacter americanus* and *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Citrus Plants. *Phytopathology*, 99 (3), 301-306.

López, S. A., Frare, G. F., Bertolini, E., Cambra, M., Fernandes, N. G., Ayres, A. J., ... y Bové, J. M. (2009). Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: *Candidatus Liberibacter asiaticus* is heat tolerant, *Candidatus Liberibacter americanus* is heat sensitive. *Plant Disease*, 93 (3), 257-262.

López, E., Romero, M., Ortiz, A., y Orduz, S. (1999). Primer registro de *Metarhizium anisopliae* infectando reinas de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 25, 49-56.

Lozano Contreras, M. G., y Jasso Argumedo, J. (2013). Identificación de enemigos naturales de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en el estado de Yucatán, México. *Fitosanidad*, 16 (1), 5-11.

Marin, P., y Bustillo, A. E. (2008). Selección de aislamientos de *Beauveria bassiana* virulentos a *Compsus n* sp.

Marmolejo, D. F., Mejía, R., Tenorio, I. H., Terranova, A. M. P., y Flórez, J. E. M. (2008). Caracterización molecular de 15 aislamientos de *Beauveria bassiana* asociados con *Cosmopolites* y *Metamasius* en platano y banano en tres regiones de Colombia. *Acta Agronomica*, 57 (3), 199-204.

Maschio, F. (2011). Ações adotadas pelo citricultor para o manejo do Huanglongbing (HLB, Greening) no parque citrícola paulista (Doctoral dissertation, MSc dissertation. Fundecitrus, Araraquara), Brazil.

Mead, F. W. (2011). Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Insecta: Hemiptera: Psyllidae). Disponible: <http://entnemdept.ufl.edu/creatures/citrus/acpsyllid.htm>

Mellín-Rosas, M. A., Sánchez-González, J. A., Fabela-Rojas, G., Cruz-Ávalos, A. M., y Arredondo-Bernal, Y. H. (2009). Selección de cepas de hongos entomopatógenos como agentes de control microbiano de ninfas y adultos de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *En*, Congreso Nacional de control Biológico. Villahermosa, 410-415.

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

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. (2012). Anuario estadístico de frutas y hortalizas 2007 - 2011 y sus calendarios de siembras y cosechas. Bogotá, 189-191.

Miranda, I., Baños, H., Martínez, M. D. L. A., y Alemán, J. (2008). Modelo teórico de la interacción de *Diaphorina citri* Kuwayana (Hemiptera: Psyllidae) con sus enemigos naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 23 (2), 126-130.

Moncayo, M. A., Almanza, M. I., Caicedo, A. M., Muñoz, J. E., y Carabali, A. (2013). Diversidad genética de *Diaphorina citri* en cultivos cítricos del Valle del Cauca y Quindío (Colombia). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12 (2), 106-114.

Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (CATIE)*, 12, 95-103.

Moorhouse, E. R., Gillespie, A. T., y Charnley, A. K. (1993). Laboratory selection of *Metarhizium* spp. isolates for control of vine weevil larvae (*Otiorhynchus sulcatus*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 62 (1), 15-21.

Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262 (4), 56-61.

Ortiz Reyes, A., Fuel, S. M., Mejía, L. M.; Guarín, J. M.; Arévalo Peñaranda, E. (2014). Biología de *Diaphorina citri* Kuwayama. En Identificación de la dinámica poblacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en los cultivos de cítricos de Colombia: una herramienta para implementar un sistema piloto de seguimiento de poblaciones del insecto vector del HLB, 8-18.

Orozco, S. C. (2011). Susceptibilidad de *Compsus n. sp.*, a *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill y *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. (Tesis de Maestría en Ciencias. Entomología. Medellín. Universidad Nacional de Colombia). Sede Medellín.

Paccola-Meirelles, L. D., y Azevedo, J. L. (1991). Parasexuality in *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57 (2), 172-176.

Padulla, L. F. L., y Alves, S. B. (2009). Suscetibilidade de ninfas de *Diaphorina citri* a fungos entomopatógenos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 76, 297-302.

Padulla, L. F. L. (2007). Estudio de hongos entomopatogênicos para o controle de ninfas do psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) (Mestre dissertation, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz).

Padilla-Melo, G. N., Bernal-Uribe, M. G., Vélez-Arango, P. E., y Montoya-Restrepo, E. C. (2000). Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes órdenes insectiles. *CENICAFÉ*, 51 (1), 28-40.

Pedrini, N., Crespo, R., y Juárez, M. P. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology*, 146 (1), 124-137.

Pelczar, M. J., Reid, R. D., y Chan, E. C. S. (1981). Microbiología 2d Edición. McGraw-Hill.

Pelz Stelinski, K. S., Brlansky, R. H., Ebert, T. A., y Rogers, M. E. (2010). Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology*, 103 (5), 1531-1541.

Petit, E., y Gubler, W. D. (2005). Characterization of *Cylindrocarpon* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. *Plant Disease*, 89 (10), 1051-1059.

Pinto, A. P. F., Batista Filho, A., de Almeida, J. E. M., y Wenzel, I. M. (2013). Patogenicidade de *Beauveria bassiana* ao psíldeo *Diaphorina citri* e compatibilidade do fungo com produtos fitossanitários. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47 (12), 1673-1680.

Polston, J. E., y Sherwood, T. (2003). Pymetrozine interferes with transmission of Tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytoparasitica*, 31 (5), 490-498.

Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25 (2), 78-82.

Quesada-Moraga, E., Navas-Cortés, J. A., Maranhao, E. A., Ortiz-Urquiza, A., y Santiago-Álvarez, C. (2007). Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research*, 111 (8), 947-966.

Qureshi, J. A., Rogers, M. E., Hall, D. G., y Stansly, P. A. (2009). Incidence of invasive *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and its introduced parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Florida citrus. *Journal of Economic Entomology*, 102 (1), 247-256.

Rath, A. C. (2000). The use of entomopathogenic fungi for control of termites. *Biocontrol Science and Technology*, 10 (5), 563-581.

Rehner, S. A., y Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97 (1), 84-98.

Rehner, S. A., Posada, F., Buckley, E. P., Infante, F., Castillo, A., y Vega, F. E. (2006). Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93 (1), 11-21.

Restrepo Quiróz, T. I. (2015). Aislamiento, identificación y evaluación de hongos entomopatógenos como posibles agentes de control de trips (Thysanoptera: Thripidae) asociados a cultivos de aguacate (*Persea americana* Miller). (Tesis Maestría. Medellín: Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín).

Rhodes, D. J., Smith, J. D., y Faull, J. L. (1992). Techniques for quantifying the ecological and pathological characteristics of entomopathogenic fungal strains. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference Pests and Diseases*, 351-356.

- Rivero Aragón, A., y Grillo Ravelo, H. (2000). Enemigos naturales de *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) en la región central de Cuba. *Centro Agrícola*, 27 (3), 87-88.
- Roberts, D. W., y Humber, R. A. (1981). Entomogenous fungi. *Biology of conidial fungi*, 2, 201-236.
- Robles, G. P. (2008). Manual técnico para la detección y manejo del Huanglongbing de los cítricos. *Dirección General de Sanidad Vegetal. Senasica SAGARPA*.
- Robles, G. P., Sánchez, A. H., y Delgadillo, V. I. (2009). Programa Nacional Para la Detección del Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter* spp.) En México. Dirección General de Sanidad Vegetal. SENASICA-SAGARPA.
- Rodríguez, I. V. (2012). Identificación de ácaros que afectan cultivos de naranja Valencia (*Citrus sinensis* L.) en el núcleo sur occidental de Colombia y establecimiento de dinámica de población y fenología de algunas especies de importancia económica (Doctoral dissertation, Tesis de doctorado en Ciencias Agropecuarias. Línea Protección de Cultivos. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 198 pp).
- Rojas, A. (2011). Conceptos y Práctica de Microbiología General. *Editorial: Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Colombia*.
- Roskov, Y., Kunze, T., Paglinawan, L., Orrell, T., Nicolson, D., Culham, A., ... & Hernandez, F. (2015). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life. *2015 Annual Checklist* [[http:// www.catalogueoflife.org/col](http://www.catalogueoflife.org/col). Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands ].
- Ruan, C., Xia, Y., Liu, B., Chen, J., Zhu, Y., Fan, G., y Sequeira, R. (2010). Entomopathogenicity and DNA analysis of anewly-isolated fungi infecting *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae).

Sakai, A. K., Allendorf, F. W., Holt, J. S., Lodge, D. M., Molofsky, J., With, K. A., ... y McCauley, D. E. (2001). The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 305-332.

Sambrook, J., Maccallum, P., Russel, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor, NY. ISBN 0-87969-577-3: 2344.

Samson, R. A. (1974). *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Stud. Mycol.*, 6, 1-119.

Sánchez, G., Zamora, H., y Arredondo, B. (2010). Producción masiva de *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoide del psílido asiático de los cítricos. In *Memorias del I Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del psílido asiático de los cítricos y el HLB en Mexico*. Monterrey, Nuevo León, México, 137-141.

Sandoval-Rincón, J. A., Curti-Díaz, S. A., Díaz-Zorrilla, U. A., Medina-Urrutia, V. M., y Robles-González, M. (2010). Alternativas para el manejo del psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri* Kuwayama). In *VI Simposio Internacional Citrícola. Tecomán-Colima*.

SAS Institute. (2012). Introduction to Bayesian Analysis Procedures. *SAS/STAT user's guide, version 9.2*. Cary, NC: SAS institute, (2), 141-179.

Sistema de Estadísticas Agropecuarias SEA. (2013). Consultado 15 de Septiembre de 2015. Disponible en:

[http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/ReportesAjax/parametros/reporte16\\_2011.aspx?cod=16](http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/ReportesAjax/parametros/reporte16_2011.aspx?cod=16)

SENASICA. (2010). Manual técnico para la reproducción masiva de *Tamarixia radita*. Convenio SENASICA – CESAVECOL. Mexico, 28.

SENASICA-SAGARPA. "Centro Nacional de Referencia de Control Biológico CNRCB" [en línea]. Mensaje en: <josue.ramosdelgado@gmail.com>. 6 mayo 2013; EST [ref. de 25 febrero 2015; 05:30 EST]. Message-ID: <angeliber@hotmail.com>. Comunicación personal.

Serra, C. A., y Andreas, C. (2006). Manejo integrado de plagas de cultivos: estado actual y perspectivas para la República Dominicana. *CEDAF. Santo Domingo*.

Shahid, A. A., Rao, Q. A., Bakhsh, A., y Husnain, T. (2012). Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. *Archives of Biological Sciences*, 64 (1), 21-42.

Skelley, L. H., y Hoy, M. A. (2004). A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. *Biological Control*, 29, 14-23.

Subandiyah, S., Nikoh, N., Sato, H., Wagiman, F., Tsuyumu, S., y Fukatsu, T. (2000). Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera, Psylloidea) in Indonesia. *Mycoscience*, 41 (5), 509-513.

Sun, B. D., y Liu, X. Z. (2008). Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. *Applied Soil Ecology*, 1 (39), 100-108.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., y Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2725-2729.

Tamura, K., y Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10 (3), 512-526.

Tanada, Y., y Kaya, H. K. (1993). Fungal infections. *Insect Pathology*. Academic Press, 318-366

Teixeira, D. C., Saillard, C., Eveillard, S., Danet, J. L., da Costa, P. I., Ayres, A. J., y Bové, J. (2005). *Candidatus Liberibacter americanus*, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55 (5), 1857-1862.

Téllez, A., Cruz, M. G., Mercado, Y., Asaff, A., y Arana, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*, 30, 73-80.

Tiwari, S., Mann, R. S., Rogers, M. E., y Stelinski, L. L. (2011). Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. *Pest Management Science*, 67 (10), 1258-1268.

Tiwari, S., Killiny, N., Mann, R. S., Wenninger, E. J., y Stelinski, L. L. (2013). Abdominal color of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, is associated with susceptibility to various insecticides. *Pest Management Science*, 69 (4), 535-541.

Tsai, J. H., y Liu, Y. H. (2000). Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. *Journal of Economic Entomology*, 93 (6), 1721-1725.

Tsai, J. H., Wang, J. J., y Liu, Y. H. (2000). Sampling of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on orange jessamine in southern Florida. *Florida Entomologist*, 446-459.

Tulloch, M. (1976). The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society*, 66 (3), 407-411.

Valadez Moctezuma, E., y Kahl, G. (2005). Huellas de ADN en genomas de plantas.

Van Vuuren, S. P., y Da-Graca, J. V. (1977). Comparison of thin layer chromatographic methods for indexing citrus greening disease. *Phytophylactica*.

Vargas, J. M. (2013). Método analítico. Determinación mediante caracteres morfológicos de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en Colombia.

Vargas Flores, M. (2003). Caracterización de tres cepas de *Beauveria brongniartii* (saccardo) patch y su virulencia en *Phthorimea operculella* (Séller) y *Symmetrischema tangolias* (Gyen) (Doctoral dissertation, Tesis. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú, 78pp).

Vestergaard, S., Gillespie, A. T., Butt, T. M., Schreiter, G., y Eilenberg, J. (1995). Pathogenicity of the hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Biocontrol Science and Technology*, 5 (2), 185-192.

Vey, A., Fargues, J., y Robert, P. (1982). Histological and ultrastructural studies of factors determining the specificity of pathotypes of the fungus *Metarhizium anisopliae* for scarabeid larvae. *Entomophaga*, 27 (4), 387-397.

Vilcinskis, A., y Götz, P. (1999). Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. *Advances in Parasitology*, 43, 267-313.

Wang, C., Shah, F. A., Patel, N., Li, Z., y Butt, T. M. (2003). Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structure of *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology*, 5 (10), 908-915.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., y Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18 (1), 315-322.

Xie, P. H., Su, C., y Lin, Z. G. (1988). A preliminary study on an entomogenous fungus *Verticillium lecanii* of *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *China Journal Biological Control*, 4 (2), 92.

Xu, C. F., Xia, Y. H., Li, K. B., y Ke, C. (1988). Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. In *Proc. 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, CA*, 243-248.

Yamamoto, P. T. (2008). Controle de insetos vetores de bactérias causadoras de doenças em citros. *Manejo Integrado de Pragas dos Citros, ESALQ/USP, Piracicaba, SP*, 237-260.

Yamamoto, P. T., y Miranda, M. P. (2009). Controle do psilídeo *Diaphorina citri*. *Ciência e Prática*, 1, 10-12.

Yang, C. T. (1984). Psyllidae of Taiwan. *Special Publication, Taiwan Museum*, (3), 37-41

Yang, Y., Huang, M., C. Beattie, G. A., Xia, Y., Ouyang, G., y Xiong, J. (2006). Distribution, biology, ecology and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, a major pest of citrus: a status report for China. *International Journal of Pest Management*, 52 (4), 343-352.