



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**BIOLOGÍA, ECOLOGÍA Y CONTROL DE  
*DIAPHORINA CITRI* KUWAYAMA  
(HEMIPTERA: PSYLLIDAE)**

**MARICARMEN SÁNCHEZ BORJA**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

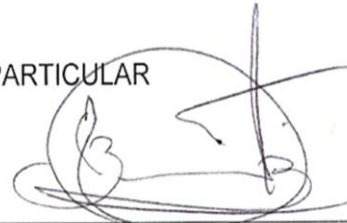
2010

La presente tesis titulada **Biología, Ecología y Control de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)**, realizada por la alumna: **Maricarmen Sánchez Borja**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



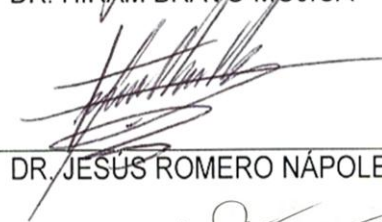
DR. NÉSTOR BAUTISTA MARTÍNEZ

ASESOR



DR. HIRAM BRAVO MOJICA

ASESOR



DR. JESÚS ROMERO NÁPOLES

ASESOR



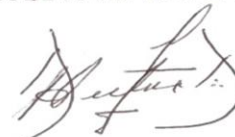
DR. VÍCTOR LÓPEZ MARTÍNEZ

ASESOR



DR. SAMUEL RAMÍREZ ALARCÓN

ASESOR



DR. HÉCTOR DE BERNARDI DE LA  
VEQUIA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, a 30 de junio de 2010

BIOLOGÍA, ECOLOGÍA Y CONTROL DE *Diaphorina citri* KUWAYAMA  
(HEMIPTERA PSYLLIDAE)

Maricarmen Sánchez Borja, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2010.

Resumen

Los cítricos mexicanos son de gran importancia económica en Cuitláhuac, Veracruz; entre éstos, el limón Persa es el cultivo de mayor importancia económica debido a que ocupa la mayor superficie de producción y genera mayores divisas para los productores. Sin embargo, la citricultura mexicana se ve amenazada por la presencia de *Diaphorina citri*, un insecto que causa daños en el cultivo cuando se encuentra presente en altas densidades poblacionales; la mayor amenaza en cuanto a pérdidas económicas es provocada por la enfermedad de Huanglongbing (HLB), donde este insecto es uno de los vectores principales. Debido a la falta de información en cuanto al conocimiento de esta plaga y al desconocimiento de la presencia del patógeno en la localidad de Cuitláhuac Veracruz, se plantearon los siguientes objetivos: estudiar la biología y fluctuación poblacional de *Diaphorina citri* y de sus enemigos naturales; evaluar productos químicos para el control de *D. citri* y detectar la presencia de HLB. El psílido se encontró presente durante todo el año, las variaciones poblacionales parecen estar asociadas de manera proporcional inversa a factores de clima (principalmente precipitación) así como a la presencia de brotes tiernos que proporcionan los requerimientos nutritivos para el desarrollo del psílido. Los enemigos naturales, aunque se presentaron todo el año no fueron un factor clave en la regulación del psílido durante el periodo de estudio; sin embargo, la detección de enemigos naturales, nos permitió pensar que se empieza a realizar un ensamble ecológico. *Tamarixia* sp. es un parasitoide de ninfas que demostró tener la capacidad de reducir de manera significativa el número de ninfas del psílido y que en el futuro podría ser un agente de control biológico importante. Los insecticidas abamectina e imidacloprid aplicados al follaje redujeron significativamente la población de ninfas en el cultivo hasta los veinte días posteriores a la aplicación, proporcionando niveles de control por encima del 90% de eficacia biológica. El spiromesifen también puede ser un producto recomendado para el control de ninfas de *D. citri*, ya que a los 7 y 14 días de haberlo aplicado tuvo un 83 % y 88% de eficacia, respectivamente. Para la detección de HLB se realizó primeramente un análisis de nutrientes, debido a que la deficiencia de éstos pueden confundirse con la sintomatología de la enfermedad; se encontró que en general los árboles muestreados presentaron deficiencias nutrimentales y no se detectó la presencia del patógeno en el cultivo.

Palabras clave: abundancia poblacional, psílido asiático de los cítricos, detección HLB

## BIOLOGY OF *Diaphorina citri* Kuwayama (HEMIPTERA PSYLLIDAE)

Maricarmen Sánchez Borja, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2010.

### Abstract

The culture of mexican citrics are of great economic importance in Cuitlahuac, Veracruz; Persian lemon is the most economically important crop because it occupies the largest area of production and generate more foreign exchange of the producers. However, the mexican citrus industry is threatened by the presence of *Diaphorina citri*, an insect that causes the major damage to the crop when it is present in high densities; however, the greatest threat in terms of economic loss is not caused primarily by these insect, but because is the main vectors of the disease Huanglongbing (HLB). Because of the lack of information in the knowledge of this pest, and ignorance of the presence of the pathogen in Veracruz, Cuitláhuac the following objectives were taken account: to study the biology and fluctuation of *Diaphorina citri* and their natural enemies, assessing chemical control to *D. citri* and to corroborate the presence of HLB. The psyllid was present throughout the year, the population variation appear to be associated inversely proportional to climate factors (mainly precipitation) as well as the presence of citric shoots that provide the nutritional requirements to the development of psyllids. About natural enemies, although they presented the whole year they were not a key factor in regulating psyllid population during the study period; however the detection of natural enemies, makes us think that there starts to form an ecological assemblage. For example *Tamarixia* sp., a parasitoid of psyllid nymphs, demonstrated the capacity to reduce significantly the number of nymphs; so in the future this natural enemy could be an important biological agent of control. There were found that abamectin and imidacloprid insecticides applied to foliage, significantly reduced the population of psyllid nymphs in the crop until 21 days after the application, providing levels of control over 90%. The spiromesifen product may also be recommended for control of *D. citri* nymphs, because after 7 and 14 days of the application we got 83% and 88% of efficiency, respectively. Before the detection of HLB, there was conducted a nutrient analysis because the nutritional deficiency may mimic the symptoms of the disease; I found that in general the sampled trees had nutritional deficiencies and I did not detect the presence of the pathogen in trees.

Key words: population abundance, Asian citrus psyllid, detection HLB

## **Dedicatoria**

A mi familia, mi mayor tesoro

Gracias, por su apoyo incondicional ante la adversidad, sin ustedes como fuente básica de energía en mi vida, simplemente no hubiera culminado con este proyecto.

Mamá el apoyo que me has brindado siempre, es invaluable, no tengo palabras para darte las gracias, no hay nadie como tú, eres mi ejemplo a seguir. Papá gracias por tu apoyo, hermanos, cuñadas, sobrinos, tías, primos, de quienes he aprendido que la humildad no ésta peleada con el conocimiento y siempre hay algo nuevo que aprender.

A tí mi amado Beto, gracias por apoyarme de esa manera tan especial que siempre tendré presente.

Y gracias a dios porque me ha permitido gozar de todo lo vivido hasta el momento y por permitirme encontrar ángeles en el camino (mis amigas y amigos).

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por apoyarme económicamente para lograr este objetivo en mi vida.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por otorgarme la beca tesis, promoción 2007, para realizar parte de mi investigación.

Al Colegio de Postgraduados por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de postgrado, tanto de Maestría en Ciencias y ahora de Doctorado

A los profesores que durante mi estancia en esta institución me transmitieron sus conocimientos y experiencias profesionales y de gran ejemplo a seguir.

Al Dr. Néstor Bautista Martínez por su disposición y apoyo invaluable que contribuyeron en gran medida a la conclusión de la presente tesis y a la culminación de este Postgrado.

A mis estimados Doctores, Hiram Bravo Mojica, Jesús Romero Nápoles, Samuel Ramírez Alarcón, Víctor López Martínez y Héctor de Bernardi de la Vequia, por sus valiosas sugerencias en el desarrollo de este documento y por darme un apoyo incondicional durante este proceso de aprendizaje y formación profesional y personal.

A mis amigas y amigos doctores, maestros en ciencia, ingenieros, biólogos, técnicos, secretarías, personal de apoyo, etc. mil gracias porque sin ustedes, nosotros los alumnos y esta institución no saldríamos a flote y sobre todo gracias por su amistad.

Hay mucho que agradecer a todas las personas que compartieron momentos inolvidables, compañeras y compañeros, con quienes compartí alegrías y penas en el transcurso de este pasaje de mi vida en el Colegio de Postgraduados y fuera de él, gracias por hacer que cada momento fuera especial.

## Contenido

1. Introducción general.....	1
2. Objetivos.....	5
3. Literatura citada.....	6
Capítulo I. Abundancia poblacional y enemigos naturales del psílido de los cítricos, <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama (Hemiptera: Stenorrhyncha: Psyllidae), en Limón Persa en Cuitláhuac, Veracruz.....	8
Resumen.....	8
Abstract.....	9
1.1 Introducción.....	10
1.2 Materiales y métodos.....	12
1.2.1 Ubicación del experimento.....	12
1.2.2 Incidencia del psílido de los cítricos.....	12
1.2.3 Detección de enemigos naturales.....	12
1.2.3.1 Identificación del material entomológico.....	13
1.2.3.2 Análisis estadístico.....	13
1.3 Resultados y discusión.....	13
1.3.1 Incidencia del psílido de los cítricos.....	13
1.3.2 Detección de enemigos naturales.....	19
1.4 Conclusiones.....	19
1.5 Literatura citada.....	20
Capítulo II. Evaluación de eficacia biológica de productos químicos para el control de <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama en Limón Persa, Cuitláhuac, Veracruz, México.....	244
Resumen.....	24
Abstract.....	25
2.1 Introducción.....	26
2.2 Materiales y métodos.....	27
2.2.1 Localización del área de estudio.....	27
2.2.2 Diseño experimental, aplicación y evaluación de tratamientos.....	27
2.2.3 Análisis de datos.....	28
2.3 Resultados y discusión.....	28
2.4 Conclusiones.....	30

2.5 Literatura citada.....	30
Capítulo III. Diagnóstico de muestras con síntomas semejantes a la enfermedad de huanglongbing en Limón Persa, ( <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Sweet cv. 'Tahiti'), en Cuitláhuac, Veracruz. ....	33
Resumen.....	33
Abstract.....	34
3.1 Introducción.....	35
3.2 Materiales y métodos .....	36
3.2.1 Localización del área de estudio .....	36
3.2.2 Colecta de muestras para análisis de nutrientes.....	36
3.2.3 Procesamiento de muestras para análisis de nutrientes.....	37
3.2.3.1 Nitrógeno total (Método Kjeldahl).....	37
3.2.3.2 Fósforo (Método del Vanadato –Molibdato Amarillo).....	38
3.2.3.3 Potasio (Emisión de llama flamometría) .....	38
3.2.3.4 Calcio y Magnesio (absorción atómica) .....	38
3.2.3.5 Zinc, Manganeso, Fierro y Cobre (Absorción atómica).....	39
3.3 Diagnóstico de HLB.....	39
3.3.1 Extracción de DNA.....	40
3.3.2 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR) convencional. ....	41
3.3.3 Preparación de la mezcla PCR .....	41
3.4 Resultados y discusión.....	42
3.4.1 Análisis de nutrientes .....	42
3.4.2 Diagnóstico de HLB .....	44
3.4.2.1 Extracción de DNA.....	44
3.4.2.2 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR) convencional. ....	44
3.5 Conclusiones.....	45
3.6 Agradecimientos.....	466
3.7 Literatura citada.....	46
4 . Conclusiones generales .....	48



## Lista de cuadros y figuras

Cuadro 1. Productos y dosis de aplicación. ....	28
Cuadro 2. Promedio de ninfas por brote y porcentaje de eficacia para cada tratamiento en Limón Persa. Mayo de 2009 en Cuitláhuac, Ver.....	29
Cuadro 3. Resultados del análisis de contenido nutrimental en limón Persa en Cuitláhuac, Veracruz. ....	42
Cuadro 4. Intervalos de concentración de nutrientes suficientes para Limón Persa (Benton <i>et al.</i> , 1991).....	43
Figura 1. Fluctuación poblacional de <i>Diaphorina citri</i> en Cuitlahuac, Ver., de junio de 2006 a junio de 2007 .....	14
Figura 2. Promedio de temperatura mínima, máxima y precipitación pluvial en Cuitláhuac, Ver., de junio de 2006 a junio de 2007.....	15
Figura.3 Fluctuación poblacional de <i>Diaphorina citri</i> en Cuitláhuac, Ver., de junio de 2007 a junio de 2008. ....	16
Figura 4. Promedio de temperatura mínima, máxima y precipitación pluvial en Cuitláhuac, Ver., de junio de 2007 a junio de 2008.....	17
Figura 5. Hojas de Limón Persa con deficiencia de zinc. ....	43
Figura 6. Gel de agarosa al 1% mostrando el DNA extraído de las plantas de limón Persa en Cuitláhuac, Veracruz. ....	44
Figura 7. Gel de agarosa donde se amplificó al patógeno de HLB. ....	45

## 1. Introducción general.

En México la actividad citrícola es de gran importancia económica dentro de la fruticultura nacional; la superficie con cítricos supera las 526,000 ha, que producen un promedio anual de 6,700,000 toneladas de fruta con un valor estimado de 8,050 millones de pesos, lo que sitúa a nuestro país en el quinto lugar mundial de producción de estos cítricos. En Veracruz, la superficie cultivada de limón persa es de 24,794 ha lo que representa el 57.80% de la superficie dedicada a este cítrico.

La globalización ha incrementado el riesgo de introducción de plagas hacia nuevas regiones, por lo que en el mundo, en el caso de los cítricos, se han invertido millones de dólares anualmente para la prevención, cuarentenas, programas de erradicación y control de plagas (Sánchez *et al.*, 2005).

En México, se reportó por primera vez en el 2002 la presencia de *Diaphorina citri* atacando a todas las especies de cítricos, además de ser uno de los vectores que trasmite la enfermedad de huanglongbing, que está afectando a la citricultura mundial; por ello se considera una plaga de gran importancia económica y cuarentenaria a lo que se agregan los problemas que esto acarrea a las exportaciones y comercio de productos frutícolas.

La especie *D. citri* presenta un corto período de vida y una alta fecundidad. Las hembras, tienen un período de oviposición de 12 días y son capaces de depositar varios huevos por jornada, los cuales eclosionan a los 3 días en verano y hasta los 23 días en invierno. El ciclo completo es de 15-47 días, pudiendo existir hasta 10 generaciones por año. Un comportamiento típico de este insecto es saltar de las hojas cuando éstas son removidas, al estar sobrepobladas o cuando las condiciones de éstas no son apropiadas para su desarrollo, en estos casos los insectos efectúan un corto vuelo de 3-5 metros, diseminándose así la enfermedad dentro de la plantación. En algunas ocasiones los cortos vuelos toman una altura de 5-7 metros del suelo lo que propicia que los insectos sean arrastrados por las corrientes de aire y trasladados a distancias de 0.5 a 4 km de su sitio previo.

Las ninfas y adultos causan daño directo al extraer grandes cantidades de savia en las hojas y pecíolos, con el consiguiente debilitamiento de las

plantas. El daño indirecto se debe a que es uno de los principales vectores de la enfermedad "citrus greening" actualmente llamada "huanglongbing" (HLB), cuyo agente causal es una bacteria altamente peligrosa que habita en el floema. Las plantas infectadas no llegan a vivir más de 5 a 8 años. El psílido adquiere la capacidad de transmitir la enfermedad después de un corto período de 15 a 30 minutos de alimentación y permanecen infectivos durante toda su vida (3-4 meses). En México actualmente el psílido *Diaphorina citri* se encuentra distribuido en todo el país (SENASICA, 2010).

La enfermedad huanglongbing o HLB (en chino: enfermedad del dragón amarillo, por la apariencia que toman las plantas infectadas), fue detectada en 1951 en China. Posteriormente se reportó en Sudáfrica, lo que propició que a través de los años se diseminará también a varios países y Asia como (Arabia Saudita, Bhutan, Filipinas, India, Indonesia, Isla Reunión, Japón, Madagascar, Malasia, Nepal, Pakistán, Sri Lanka, Taiwan, y Vietnam, entre otros). Hasta el 2004 no se había tenido ningún reporte de la presencia de esta enfermedad en los países de América. Sin embargo, en ese mismo año se encontró en Brasil (Sao Paulo). En septiembre de 2005 se confirma su presencia en Florida, EUA; actualmente ya está presente en muchos países de Centro América. En México ya está presente en algunos municipios de Yucatán, Quintana Roo, Nayarit y Jalisco, actualmente se considera en condición de enfermedad "confinada" y en el estatus de "bajo control fitosanitario" (SENASICA, 2010).

En la actualidad se reconocen tres formas de HLB: asiática, africana y americana. El organismo causal es la bacteria gram negativa "*Candidatus Liberibacter*" la cual recibe este nombre porque no ha sido posible aislarla en un cultivo puro con medios artificiales (Sechler *et al.*, 2009). Este organismo se restringe al floema de las rutáceas y tiene la capacidad de multiplicarse en las glándulas salivales de los psílicos vectores. Dentro de estos insectos cruza la pared intestinal, vía hemolinfa, tomándose de 1 a 3 semanas según la virulencia de la cepa.

Las formas difieren en la temperatura a la que se manifiestan sus síntomas más agudos. La forma africana (*Candidatus Liberibacter africanus* (Laf)) presenta síntomas en una temperatura de 22-24 °C, mientras que la forma asiática (*Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las)) los presenta a una temperatura de 27-32 °C. La forma asiática fue reportada en Brasil en marzo de

2004 (Texeira *et al.*, 2005). La forma americana (*Candidatus Liberibacter americanus* (Lam)) fue reportada en septiembre del 2005, en el estado de la Florida, E.U.A., siendo de gran preocupación para la industria de los cítricos (Li *et al.*, 2006).

Esta enfermedad afecta a todas las especies y variedades combinaciones cítricas (copa/pie). Algunos autores mencionan que los síntomas se expresan de manera más severa en naranja dulce (*Citrus sinensis*), mandarinas (*Citrus reticulata*) y tangelos; en tanto que síntomas moderados en toronjas (*Citrus paradisi*), limones (*Citrus limon*), naranja agria (*Citrus aurantium*), naranja trifoliata con sus híbridos, lima mexicana (*Citrus aurantifolia*) y pomelo (*Citrus maxima*) (Manicom y Van Vuuren, 1990; Manjunath *et al.*, 2008).

Entre los síntomas de infección más comunes está la clorosis de las hojas, misma que puede confundirse con la carencia de zinc y marchitez de los tallos. Los árboles afectados por HLB pierden su capacidad productiva dependiendo de las variedades y la edad de la planta afectada. Los síntomas se observan claramente en árboles jóvenes y vigorosos, mientras que en los afectados después de su desarrollo, son menos marcados (Brlansky *et al.*, 2005; Etxberria *et al.*, 2007). Los tejidos a lo largo del nervio central de las hojas recién formadas y las venas secundarias se tornan amarillos y la clorosis se difunde sobre las nervaduras laterales hasta que la hoja se cae. Las hojas jóvenes afectadas permanecen de tamaño pequeño, ocurriendo el proceso de forma más severa. En general presentan síntomas parecidos a deficiencias de minerales de zinc, hierro, calcio, magnesio y manganeso y presentan manchas circulares o angulares de color amarillo, llegándose a tornar totalmente amarillas con manchas verdes (Timmer *et al.*, 2003). Las plantas muestran una considerable defoliación con muerte apical en pocos años de ocurrida la infección, generalizándose también el moteado y el amarillamiento. Se desarrollan brotes múltiples con hojas pequeñas, pálidas y moteadas creciendo en posición erecta. Durante la infección se muestran fuertes floraciones con un pobre “cuajado” de frutos, existe la caída prematura de éstos y los que se mantienen en el árbol son pequeños y asimétricos, tomando la coloración correcta la parte expuesta al sol, mientras que la otra parte toma una coloración verde olivo intenso.

Los frutos afectados contienen una baja cantidad de jugo, además de poca concentración de sólidos solubles y azúcares, por lo que son muy ácidos y no pueden utilizarse en la industria (sabor amargo-salado desagradable). El fruto queda deforme y se reduce su tamaño, internamente el fruto puede presentar diferentes grados de maduración (lados oscuros, amarillos y otros verdes); en la cáscara pueden aparecer pequeñas manchas circulares verde-claras en contraste con el verde del fruto y en algunos casos, el albedo (la parte blanca de la cáscara) se presenta con espesura mayor de la normal (Floyd y Krass, 2006).

Las semillas son pequeñas, semidesarrolladas y atrofiadas (muy pocas logran un buen desarrollo), con una coloración oscura dispareja, a menudo con manchas. El sistema radicular se encuentra poco desarrollado y con poca cantidad de pelos absorbentes (Shokrollah *et al.*, 2009). La diseminación de la enfermedad a grandes distancias ocurre mediante el traslado de yemas y plantas contaminadas, razón por la cual los países afectados han implementado programas estrictos de certificación mediante los cuales se garantiza que llevan a campo plantas sanas.

Entre los desastres económicos se indica que en la Isla Reunión y Tailandia se reportan plantaciones enteras abandonadas. En Filipinas, la producción de mandarinas en 1960 fue de 11,700 toneladas disminuyendo debido al ataque del patógeno hasta 100 toneladas para 1970. En China durante el periodo de 1977 -1981 se eliminaron 960,000 plantas de mandarina y limones, disminuyendo la producción de la región de 450,000 a 5000 toneladas. La industria cítrica de la India está siendo destruida lentamente por esta enfermedad, mientras que todas las plantaciones de mandarinas y naranja dulce de Arabia Saudita desaparecieron totalmente durante la década de 1975-1985 (EPPO, 1988; Chung y Fan, 1990; da Graça, 1991).

En cuanto al control biológico se han introducido a Florida dos especies de parasitoides: *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) y *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae) obteniendo excelentes resultados (McFarland y Hoy, 2001). También se han observado depredadores como *Chilocorus cacti*, *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae) como buenos controladores del psílido (Pluke *et al.*, 2005; Michaud, 2001).

Para el manejo de esta plaga se ha empleado la aplicación de productos químicos como metamidofós, dimetoato, imidacloprid que han sido eficientes hasta 90% (Sohail *et al.*, 2004); también se han aplicado bioinsecticidas como el Nim obteniendo buenos resultados (Weathersbee y McKenzie, 2005); sin embargo, a largo plazo trae como consecuencia la aparición de plagas secundarias o la disminución de los enemigos naturales, esto al tener que efectuar varias aplicaciones por año.

En cuanto a la enfermedad, se recomiendan medidas preventivas y de cuarentena (uso de semillas, yemas y plantas sanas), sumadas a una estrecha vigilancia de la presencia, desarrollo de la enfermedad y sus vectores. La eliminación de las plantas enfermas se realizan para evitar fuentes de inóculo, pero debe llevarse a cabo inmediatamente después de la aparición de los primeros síntomas y ser constatados por personal calificado (Halbert y Manjunath, 2004; INISAV, 1999; Robles y Delgadillo, 2010)

El conocimiento que se tenga de la enfermedad contribuirá a evitar su entrada por las fronteras o detectarla en forma temprana. Hay que tener en cuenta que se cree que en Brasil habría ingresado en forma ilegal a través de material de injerto infectado y que los síntomas fueron confundidos por varios años con el CVC (clorosis variegada de los cítricos) y con deficiencias nutricionales.

Es importante conocer el comportamiento de esta plaga en nuestro medio, a fin de poder tomar las medidas requeridas para mantener sus poblaciones lo más bajas posibles, y si es posible su erradicación en áreas que propicien este resultado, además de reconocer cuáles son sus enemigos naturales que existen en nuestro país. Por lo tanto en la presente investigación se plantearon los objetivos que a continuación se indican.

## **2. Objetivos.**

- a) Estudiar la biología y fluctuación poblacional de *Diaphorina citri* y de sus enemigos naturales en Cuitláhuac, Veracruz.
- b) Evaluar productos químicos para el control de *D. citri*.
- c) Detectar la presencia de HLB

### 3. Literatura citada

- Brlansky, R. H., K. R. Chung, y M. E. Rogers. 2007. Florida Citrus Pest Management Guide: Huanglongbing (Citrus Greening). University of Florida. 225pp.
- Chung, K. y X. C. Fan. 1990. Successful integrated management of huanglongbing disease in several farms by combining early eradication with targeted insecticide spraying. In Proceedings of the Asia Pacific international Conference on Citriculture 4-10 de February/eds. B. Aubert; S. Tontyaporn y D. Buangsuwon\_Chiang Mai: UNDP-FAO. p:145-147.
- da Graça, J. V. 1991. Citrus Greening Disease. Annu. Rev. Phytopathol. 29: 109-136.
- EPPO, 1988. Citrus greening bacteria and vectors. EPPO Bulletin 18(3): 500-501.
- Ettxberria, E., P. González; W. Dawson y T. Spann. 2007. An Iodine- Based Starch test to assist in selecting leaves for HLB testing. University of Florida. <http://edis.ifa.ufl.edu>
- Floyd, J. y C. Krass. 2006. New Pest Response Guidelines: Huanglongbing Disease of Citrus. USDA/APHIS/PPQ—Emergency and Domestic Programs, Riverdale, Maryland.
- Halbert, S.E., y K.L. Manjunath. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. Florida Entomologist 87(3):401-402.
- Li W., Hartung, J. S. y L. Levy. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. Journal of Microbiology Methods, 66(1): 104-115
- Manicom, B. Q. y S. P. Van Vuuren. 1990. Symptoms of greening disease with special emphasis on African greening. In Proceedings of the Asia Pacific international Conference on Citriculture 4-10 de February/eds. B. Aubert; S. Tontyaporn y D. Buangsuwon\_Chiang Mai: UNDP-FAO. p:122-128
- Manjunath, K. L.; S. E. Halbert; C. Ramadugu; S. Webb y R. F. Lee. 2008. Detection of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. Phytopathology, 98(4): 387-396.
- McFarland, D. C y A. M. Hoy. 2001. Survival of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), and its two parasitoids, *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) and *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae), under different relative humidities and temperature regimes. Florida Entomologist, 84 (2): 227-234.

- Michaud, J. P. 2001. Numerical response of *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae) to infestations of Asian Citrus Psyllid, (Hemiptera: Psyllidae) in Florida. *Florida Entomologist*, 84 (4): 608-614.
- Pluke, W. R; A. Escribano; J. P. Michaud; A. P. Stansly. 2005. Potential impact of lady beetles on *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Puerto Rico. *Florida Entomologist*, 88 (2):123-128.
- Sánchez, A. H. M., G.P.L. Robles y C.J.P. Delgado. 2005. Enfermedad de los cítricos de interés cuarentenario para México. En. Memorias del curso de actualización cítrica en la campaña de manejo fitosanitario de los cítricos. Apatzingan, Mich. 141pp.
- Sechler, A., E.L. Schuenzel; P. Cooke; S. Donnua; N. Thaveechai; E. Postnikova; A. L. Stone; W. L. Schneider; V. D. Damsteegt y W. Schaadn. 2009. Cultivation of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. L. africanus* and *Ca. L. americanus* associated with Huanglongbing. *Phytopathology*, 99 (5): 480-486.
- SENASICA. (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2010. Notificación de la detección de huanglongbing en el Municipio de Tizimín, Yucatán, Méx.[En línea]. Disponible en <http://www.senasica.gob.mx/default.asp?doc=9361> (Revisado el 15 de junio de 2010).
- Shokrollah, H., T. L. Abdullah; K. Sijam y S. N. A. Abdullah. 2009. Determination of the presence of Huanglongbing in seeds and movement of the pathogen in *Citrus reticulata*. *American Journal Applied Sciences*, 6(6):1180-1185
- Sohail, A., A. Nisar y R.K. Rasah. 2004. Studies on Poblacion Dymanics and Chemical Control of Citrus Psylla, *Diaphorina citri*. *International Journal Agriculture & Biology*. 6 (6):970-973.
- Texeira, D. C., C. Saillard; S. Eveillard; J.L. Danet; I. da Costa; A. J. Ayres y J. M. Bové. 2005. *Candidatus Liberibacter americanus* associated with citrus huanglongbing (greening disease) in Sao Paulo State, Brazil. *International Journal of Sistematic and Evolutionary Microbiology*, 55:1857-1862
- Timmer, L.W., S. M. Garnsey y P. Broadbent. 2003. Diseases of Citrus In: *Disease of tropical fruit crops* (ed. R. C. Ploetz) APS. Press, USA. 163-195.
- Weathersbee III, A. A. y C. L. Mc Kenzie. 2005. Effect of a Neem biopesticide on repellency, mortality, oviposition and development of *Diaphorina citri* (Homoptera:Psyllidae). *Florida Entomologist*, 88(4): 401-407.



## Capítulo I. Abundancia poblacional y enemigos naturales del psílido de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Stenorrhyncha: Psyllidae), en Limón Persa en Cuitláhuac, Veracruz

SÁNCHEZ-BORJA MARICARMEN<sup>1</sup>, BAUTISTA MARTINEZ NESTOR<sup>1</sup>, BRAVO MOJICA HIRAM<sup>1</sup>, ROMERO NÁPOLES JESÚS<sup>1</sup>, RAMÍREZ ALARCÓN SAMUEL<sup>2</sup>, LÓPEZ-MARTÍNEZ VICTOR<sup>3</sup>, DE BERNARDI DE LA VEQUIA HÉCTOR<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Edo. de México. 56230. <sup>2</sup>Universidad Autónoma Chapingo Km 38.5 Carretera México-Texcoco. Texcoco, Edo de México. .56230. <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. 62209 México. <sup>4</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba. Km. 348 Carr. Fed. Córdoba-Veracruz. Congregación Manuel León. Amatlán de los Reyes, Ver. 94946

### Resumen

Se estudió la abundancia poblacional del psílido de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama, para esto se realizaron muestreos quincenalmente en el cultivo de limón Persa (*Citrus aurantifolia* cv "Tahiti" ) en Cuitláhuac, Veracruz; las observaciones se realizaron de junio de 2006 a junio de 2008. Las poblaciones del psílido se presentaron en todo el año; sin embargo se registraron sus niveles más altos en marzo, mayo, junio y julio del 2007 y marzo, abril y mayo de 2008. Los niveles de población de *D. citri* se relacionaron positivamente con la temperatura máxima y lluvias ocasionales; las cuales propiciaron la disponibilidad de nuevos brotes. Cabe mencionar que en periodos de floración "loca" cuando no están presentes los brotes y hay disponibilidad de botones florales, se observó también la presencia de huevecillos y ninfas en todos sus estados de desarrollo. Los enemigos naturales, aunque se presentaron todo el año no fueron un factor clave en la regulación del psílido durante el periodo de estudio; sin embargo, en junio y julio de 2006, 2007 y 2008 se llegó a observar 30 % de parasitismo de *Tamarixia* sp.

Palabras Clave: Limón persa, *Citrus* sp., monitoreo, *Tamarixia* sp., Huanglongbing.

## Abstract

We studied the population abundance of citrus psyllids *Diaphorina citri* Kuwayama, to do these there were sampled biweekly the cultivation of Persian lime (*Citrus aurantifolia* cv "Tahiti") at Cuitlahuac, Veracruz from June 2006 to June 2008. Psyllid populations were presented throughout the year, but their levels were higher in March, May, June and July 2007 to March, April and May 2008. Population levels of *D. citri* were positively related to maximum temperature and occasional rains, which allowed availability of new leaf buds; in periods of "crazy" flowering when the buds are not present but there are availability of flower buds we saw eggs and nymphs in all stages of development. The natural enemies were presented throughout the year, however they were not a key factor in regulating psyllid populations during the study period, but in June and July 2006, 2007 and 2008 we saw about 30% of parasitism of *Tamarixia* sp.

**Key words:** Persian lime, *Citrus* sp, monitoring, *Tamarixia* sp. Huanglongbing.

## 1.1 Introducción

El Psílido Asiático de los Cítricos (PAC), *Diaphorina citri* Kuwayama es una plaga que afecta a cultivos cítricos a nivel mundial y que transmite el patógeno de la enfermedad del enverdecimiento de los cítricos (huanglongbing) (Hall, 2008; Li *et al.*, 2006). Las ninfas y adultos al alimentarse de hojas y pecíolos (jóvenes), inyectan toxinas a través de la saliva causando malformaciones de hojas y brotes lo que debilita a las plantas y disminuye la producción de frutos (Nehru *et al.*, 2004).

En México, el psílido se reportó oficialmente por primera vez en 2002 en el estado de Querétaro (<http://www.pestalert.org/espanol/pestnwes.cfm>); posteriormente se registró en brotes tiernos de limón mexicano (*Citrus limon* Burmeister) en Ciudad Victoria (Tamaulipas) y en brotes de lima (*Citrus aurantifolia* (Christ.)) en Monterrey (Nuevo León) (Coronado y Ruiz, 2004). En la región cítrica de Cuitláhuac, Veracruz, este insecto se detectó en 2004 y actualmente se encuentra distribuido en todo el país (SENASICA, 2009).

*D. citri* presenta un período de vida de 3 a 4 meses aproximadamente y una alta fecundidad, las hembras tienen un período de oviposición de 12 días y pueden llegar a depositar cientos de huevos, los cuales eclosionan a los 3 días en verano y 23 días en invierno. El ciclo completo es de 15-47 días, pudiendo existir hasta 11 generaciones por año, como es el caso del área de Guangdong, China (Yang *et al.*, 2006).

El PAC provoca dos tipos de daño, el directo, causado por ninfas y adultos, los cuales al alimentarse de hojas y pecíolos (jóvenes), inyectan toxinas a través de la saliva causando malformaciones de hojas y brotes lo que debilita a las plantas y disminuye la producción de frutos. El daño indirecto se presenta cuando el PAC transmite el agente causal del huanglongbing, la bacteria *Candidatus Liberibacter* que habita en el floema (Li *et al.*, 2006). Las plantas infectadas no llegan a vivir más de 5 a 8 años. El psílido adquiere la capacidad de transmitir la enfermedad después de un corto período de alimentación de 15 a 30 minutos y permanecen infectivos durante toda su vida (3 a 4 meses) (FAO, 2003). En el 2004 esta enfermedad se reportó por primera vez en el Continente Americano en la región de Araquara en Sao Paulo, Brasil;

posteriormente (en 2005), se confirma su presencia en Florida, E.U.A. (Brlansky *et al.*, 2007), en 2007 se informó de su presencia en Cuba (da Graça, 2008) y en 2008 en Lousiana, EUA. El registro positivo de un espécimen de PAC y la presencia de la bacteria causante del huanglongbing en el estado de Yucatán, México (SENASICA, 2009), pone en relieve la importancia de monitorear la presencia de este vector en las zonas productoras de cítricos del país.

*D. citri* ha sido monitoreado principalmente en el hospedero jazmín (*Murraya paniculata* y *M. exótica* L.) naranja dulce, (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), naranja agria (*C. aurantium* L.), pomelo (*C. grandis* (L.) Osbeck, toronja (*C. paradisi* Macf), mandarina (*C. reticulata* Blanco), tangerina (*C. tangerina* Tanaka), limón rugoso (*C. jambhiri* Lushington) (Tsai and Liu, 2000; Liu y Tsai, 2000; Shivankar *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 2002; Michaud, 2003; Ahmed *et al.*, 2004; Bhagat y Nehru, 2005; Yang *et al.*, 2006; Nakata, 2006; Hall *et al.*, 2008; Pluke *et al.*, 2008; Qureshi *et al.*, 2009; Flores *et al.*, 2009) y limón Persa (*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle) (Nehru *et al.*, 2004).

En Florida EUA, se ha aplicado el control biológico clásico para el manejo de *D. citri*, para lo cual se introdujeron dos parasitoides: *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) y *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae) obteniendo excelentes resultados ya que lograron adaptarse y establecerse a las condiciones de humedad relativa y temperatura (McFarland y Hoy, 2001). En Taiwan se encontró del 80 al 90% de parasitismo de *T. radiata* (Chien *et al.*, 1991). También se han observado depredadores como *Chilocorus cacti*, *Olla v-nigrum*, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) como buenos controladores del psílido (Pluke *et al.*, 2005; Michaud, 2001); también se han reportado hongos entomopatógenos del género *Hirsutella* sp. atacando a los adultos de *D. citri* (Meyer *et al.*, 2007).

Dada la poca información de *Diaphorina citri* en nuestro país se planteó el siguiente objetivo: determinar la abundancia poblacional y enemigos naturales del psílido de los cítricos, en Limón Persa en Cuitláhuac, Veracruz.

## **1.2 Materiales y métodos**

### **1.2.1 Ubicación del experimento**

La investigación se realizó en Cuitláhuac, Veracruz, en una huerta de limón Persa (18°50' N, 96°55' O, 420 m) con árboles de 7 años de edad y sin haber sido sometidos a aplicaciones de plaguicidas. El clima de esta zona es cálido-húmedo con un promedio anual de precipitación de 2612 mm y temperaturas máxima de 36 °C (abril y mayo) y mínima de 12° C (enero). La época de lluvia se presenta en junio y a principios de septiembre (INAFED, 2005).

### **1.2.2 Incidencia del psílido de los cítricos**

Se seleccionaron al azar 10 árboles, y en cada árbol se consideraron dos estratos: el inferior, se consideró desde el nivel del suelo hasta un metro de altura y el superior, a partir de un metro hasta 2.25 m de altura. En cada estrato se tomaron cuatro brotes, uno en cada punto cardinal (norte, sur, este, oeste), se seleccionaron brotes tiernos con una longitud de 10 cm aproximadamente, en total se muestrearon 8 brotes/árbol. Se realizaron inspecciones cada 15 días en los brotes marcados y se cuantificó el número de individuos del psílido de los cítricos presente en sus diferentes estados de desarrollo (huevos, ninfa y adultos). El período de muestreo fue de junio de 2006 hasta junio de 2008.

Los datos meteorológicos corresponden a la estación meteorológica ubicada en Cuitláhuac, Veracruz del Servicio Meteorológico Nacional.

### **1.2.3 Detección de enemigos naturales**

La detección de los enemigos naturales del psílido se basó en las colectas de cada uno de los 10 árboles estudiados de 8 brotes de 10 cm de longitud, infestados por el psílido de los cítricos, cada quince días durante el periodo de estudio, (en caso de no presentarse la cantidad brotes indicados se revisaban aquellos donde se presentaban ninfas potencialmente parasitadas), éstos se transportaron en recipientes de plástico provistos con algodón húmedo para evitar la deshidratación. Posteriormente, se mantuvieron en condiciones de temperatura ambiente en laboratorio, para registrar la emergencia de

parasitoides cada tercer día se revisaban y separaban los estados de desarrollo del 3er a 5to ínstar ninfa para registrar el porcentaje de parasitismo.

Para el caso de depredadores se contabilizó la presencia de organismos en campo y se colectó material para su posteriormente identificación.

### **1.2.3.1 Identificación del material entomológico**

La determinación de especies entomófagas se realizó con claves taxonómicas de acuerdo a la familia recolectada, posteriormente se identificaron algunos a género y otras a especie, en el laboratorio de control biológico de la Universidad Autónoma Chapingo. La identificación del parasitoides fue realizada por el Dr. Refugio Lomeli (Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados).

### **1.2.3.2 Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de correlación para evaluar la relación entre las diferentes etapas de desarrollo de *D. citri*, temperatura mínima, máxima y precipitación. Para el análisis se utilizó SAS Institute 1998.

## **1.3 Resultados y discusión**

### **1.3.1 Incidencia del psílido de los cítricos**

La fluctuación poblacional del psílido de los cítricos en el primer año de estudio se puede observar en la Figura 1. Se aprecia que los tres estados de desarrollo estuvieron presentes todo el año; sin embargo, el estado de ninfa presentó la mayor densidad poblacional en los meses de marzo y junio con una media de 74 y 43 individuos por brote; la etapa de huevecillo, se observó con mayor incidencia en marzo y mayo con una media de 29 y 41 huevecillos por brote, en cuanto a los adultos la mayor abundancia se registró en junio 2006; con una media de 4 adultos por brote. Los picos poblacionales coincidieron con la presencia de los nuevos brotes.

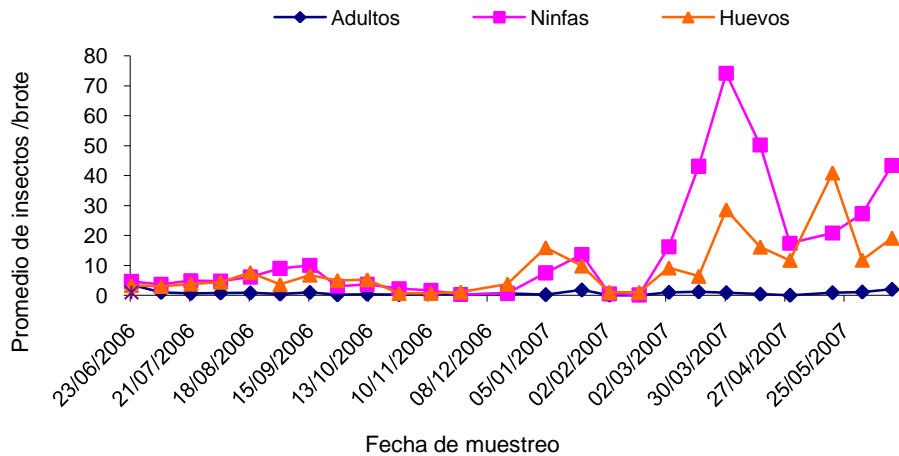


Figura 1. Fluctuación poblacional de *Diaphorina citri* en Cuitláhuac, Ver., de junio de 2006 a junio de 2007.

Las medias de la temperatura mínima, máxima y precipitación que se registraron durante el primer año de muestreo se muestran en la Figura 2. El análisis de correlación indica que la media poblacional de adultos, ninfas y huevecillos no presentaron asociación significativa con la temperatura mínima ( $r=0.2888$ ,  $n=80$ ,  $P=0.1615$ ), ( $r=-0.0084$ ,  $n=80$ ,  $P=0.9679$ ), ( $r=0.09079$ ,  $n=80$ ,  $P=0.666$ ); para temperatura máxima la correlación indica que la media poblacional de adultos no fue significativa ( $r=0.1954$ ,  $n=80$ ,  $P=0.3491$ ); sin embargo para ninfas y huevecillos, la correlación fue significativa ( $r=0.5955$ ,  $n=80$ ,  $P=0.0017$ ); ( $r=0.5387$ ,  $n=80$ ,  $P=0.0055$ ). En cuanto a la precipitación la correlación de la media poblacional de adultos, ninfas y huevecillos no fue significativa ( $r=0.0445$ ,  $n=80$ ,  $P=0.8326$ ), ( $r=-0.1069$ ,  $n=80$ ,  $P=0.6108$ ); ( $r=-0.08273$ ,  $n=80$ ,  $P=0.6942$ ).

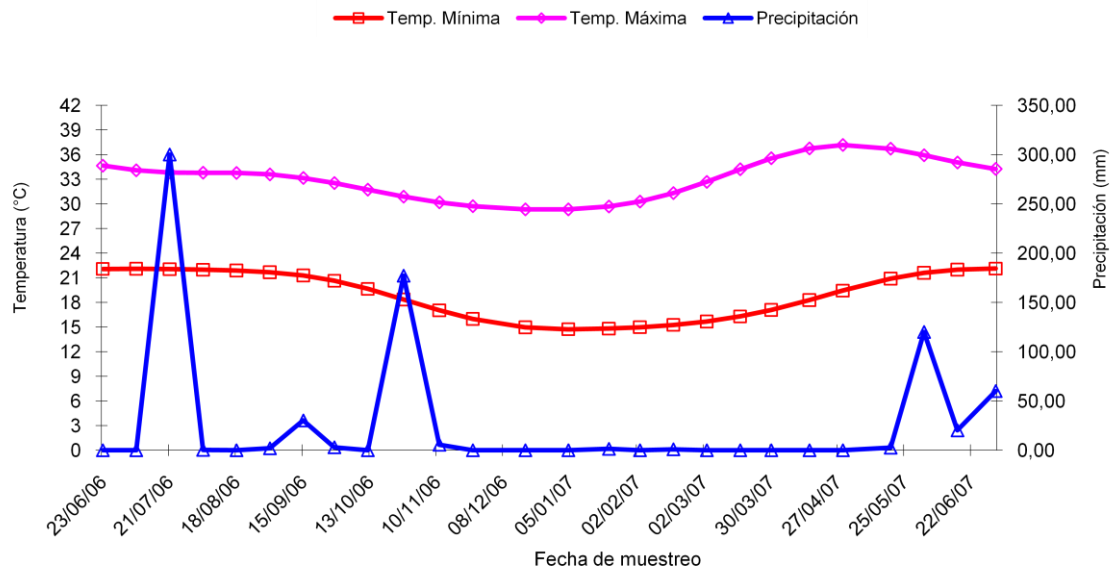


Figura 2. Promedio de temperatura mínima, máxima y precipitación pluvial en Cuitláhuac, Ver., de junio de 2006 a junio de 2007.

La menor temperatura registrada fue de 14.73 °C que ocurrió en el mes de enero de 2007. Mientras que las precipitaciones extremas se observaron durante julio y noviembre de 2006 con 300 mm y 177 mm respectivamente.

La fluctuación del psílido de los cítricos por brote en el segundo año de estudio se observa en la Figura 3; en ésta se puede apreciar que los tres estados de desarrollo estuvieron presentes todo el año y que el estado de ninfa presentó la mayor densidad poblacional en los meses de julio 2007 y marzo-abril 2008 con una media de 83 y 73 individuos por brote, respectivamente. La etapa de huevecillo tuvo los mayores picos en julio 2007 y abril 2008 con una media de 34 y 48 huevecillos por brote, respectivamente. En cuanto a los adultos, se observó la mayor incidencia en junio 2007 y marzo 2008 con una media de dos adultos por brote. Los picos poblacionales coincidieron con la presencia de los brotes.



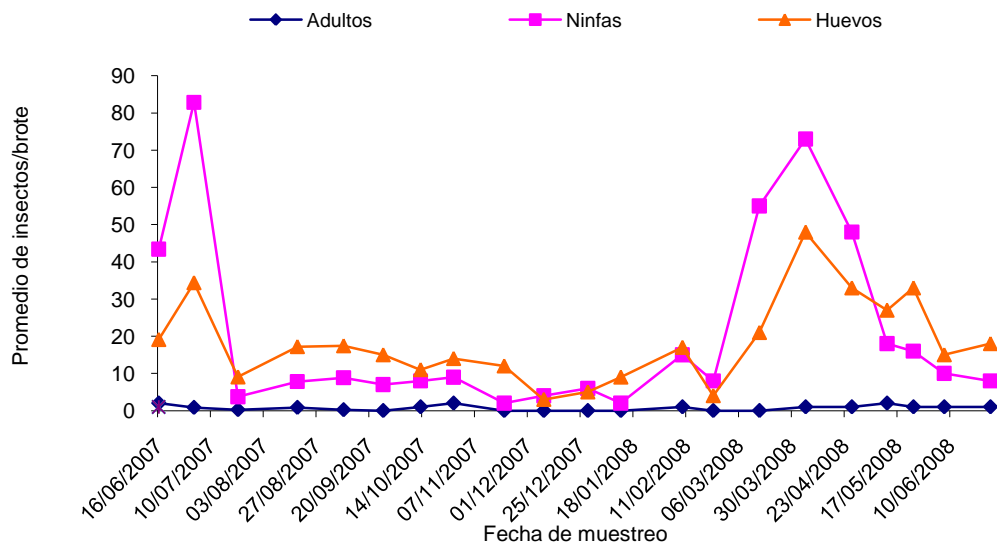


Figura.3 Fluctuación poblacional de *Diaphorina citri* en Cuitláhuac, Ver., de junio de 2007 a junio de 2008.

Las medias de la temperatura mínima, máxima y precipitación que se registraron durante la investigación se muestran en la Figura 4. El análisis de correlación indica que la media poblacional de adultos, ninfas y huevos no presentó correlación significativa con la temperatura mínima ( $r=0.3116$ ,  $n=80$ ,  $P=0.1941$ ), ( $r=0.0344$ ,  $n=80$ ,  $P=0.8888$ ) y ( $r=0.2664$ ,  $n=80$ ,  $P=0.2702$ ). Para la temperatura máxima la correlación indica que la media poblacional de adultos, no fue significativa ( $r=0.4182$ ,  $n=80$ ,  $P=0.0747$ ); sin embargo para ninfas y huevecillos fue significativa; ( $r=0.5128$ ,  $n=80$ ,  $P=0.0247$ ) y ( $r=0.7686$ ,  $n=80$ ,  $P=0.0001$ ); en cuanto a la precipitación la correlación de la media poblacional de adultos, ninfas y huevecillo indica que no fue significativa ( $r=0.1633$ ,  $n=80$ ,  $P=0.504$ ), ( $r=-0.2172$ ,  $n=80$ ,  $P=0.3717$ ); ( $r=-0.1891$ ,  $n=80$ ,  $P=0.438$ ).

La menor temperatura registrada fue de  $14.7\text{ }^{\circ}\text{C}$  que ocurrió en el mes de enero de 2007. Mientras que la mayor precipitación se observó durante julio y octubre de 2007 con 310 mm y 330 mm y junio de 2008 con 310 mm en promedio.

En nuestro país no se habían realizado estudios sobre este insecto y mucho menos en el cultivo de limón Persa, por ello con la información generada en esta investigación se podrán tomar las medidas para mantener

las poblaciones de esta plaga lo más bajas y de ser posible su erradicación en algunas áreas.

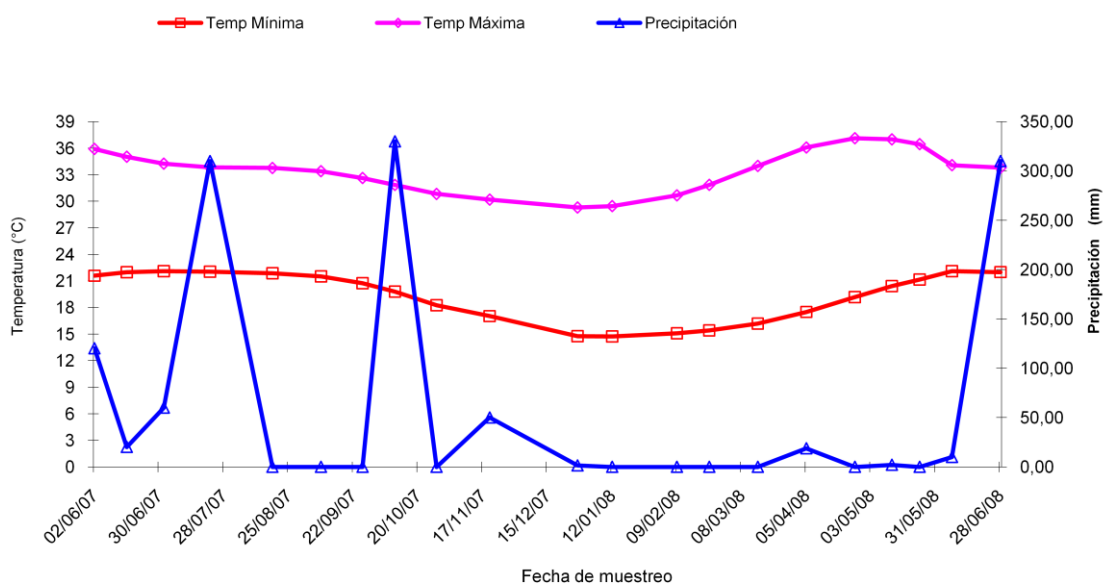


Figura 4. Promedio de temperatura mínima, máxima y precipitación pluvial en Cuitláhuac, Ver., de junio de 2007 a junio de 2008.

En el presente trabajo los resultados muestran que *D. citri* se encuentra presente todo el año en sus diferentes etapas de desarrollo, observándose la mayor incidencia poblacional en los meses de marzo, abril, mayo y junio principalmente; esto concuerda con lo reportado por Yang *et al.* (2006) para los cultivos de naranja valencia, pomelo, mandarina y jazmín donde se han observado los mayores daños en brotes. Tsai *et al.* (2002) mencionan que la mayor abundancia poblacional en Florida ocurrió en octubre, noviembre y diciembre de 1998 y mayo y agosto en 1999, debido a que había mayor disponibilidad de hojas nuevas en el hospedero *Murraya paniculata*, además que las temperaturas en estos meses fueron mayores de 20°C con una precipitación de 0.5 a 1 mm aproximadamente.

El continuo desarrollo de nuevos brotes favorece la presencia y abundancia del psílido (Qureshi *et al.*, 2009). En la presente investigación se observó que, a inicios de primavera, a mayor temperatura mayor es la abundancia de ninfas y huevos, y al presentarse lluvias ocasionales se

observaron más brotes tiernos alcanzando 74 ninfas por brote y 41 huevos por brote; sin embargo, a finales de verano y principios de otoño la precipitación fue mayor y abundante lo que disminuyó la presencia de ninfas y huevos; esto concuerda con lo reportado previamente por Pande (1971), Catling, (1970) y Yamamoto *et al.* (2001), en el hospedero jazmín y los cultivos de naranja y pomelo; quienes mencionan que las mayores densidades de población se presentan en los meses secos, disminuyendo en los meses de mayor precipitación. También esto concuerda con lo reportado por Ahmed *et al.* (2004), ellos encontraron que en el mes de abril la media poblacional de ninfas por brote en naranja fue de 12.75 y en septiembre 11.8; Bhagat y Nehru (2005) en el mismo cultivo encontraron una media poblacional en marzo de 15.2 ninfas por brote y en septiembre 15.7. Por su parte Hall *et al.* (2008), reportaron que en pomelo se encontraron en marzo, mayo y junio 16.8 ninfas y 26.5 huevecillos en promedio por brote; para jazmín en mayo y junio encontraron 12.7 ninfas y 16 huevecillos por brote, respectivamente. Estas diferencias entre las medias poblacionales de ninfas y huevos en los diferentes cultivos nos indican que las infestaciones pueden ocurrir en diferentes tiempos y no depende exclusivamente del hospedero, sino de la disponibilidad de brotes tiernos y de los factores ambientales.

Cabe mencionar que en el presente estudio durante la época de menor abundancia de brotes tiernos los adultos ovipositaron cerca de los botones florales, así que también se observaron ninfas del 1ro al y 4to estadio de desarrollo incluso cuando ya estaba formada la flor y al inicio de la fructificación. Lo que disminuye la producción de frutos ya que al debilitar el paso de nutrientes estos caen.

Los adultos se encontraron preferentemente en ramas, brotes y hojas jóvenes; en invierno cuando la temperatura al inicio del día fue de 15°C aproximadamente, los adultos se encontraron agrupados en la superficie de las hojas y los movimientos para desplazarse eran muy lentos; durante los meses de junio y julio, los adultos se observaron al inicio del día con mayor movimiento ya que saltaban enérgicamente de un lado a otro a temperaturas de 24 a 26 °C aproximadamente. También se observó que cuando la luz del día era más directa en las hojas jóvenes ya desarrolladas, éstos se desplazaban

hacia la sombra e incluso se escondían en la parte baja de las hojas; en la temporada de lluvia los adultos se veían menos activos en cuanto a su vuelo de una hoja a otra.

### 1.3.2 Detección de enemigos naturales

La densidad de enemigos naturales fueron bajas, posiblemente porque *D. citri* es un insecto reciente en el medio. Detectamos, sin embargo, a diversas especies de depredadores: *Chrysoperla* sp. (Neuroptera: Chrysopidae), *Chilocorus* sp. (Coleoptera: Coccinellidae), *Hippodamia* sp. (Coleoptera: Coccinellidae) mismos que se observaron alimentándose de huevos y ninfas; dos géneros de arañas de la familia Salticidae: *Thiodina* sp. y *Nyicerella* sp., alimentándose principalmente de adultos; todos los depredadores estuvieron presentes durante todo el año, pero no en altas densidades.

El parasitoide *Tamarixia* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), es de hábito solitario ya que un adulto parasita una ninfa de *D. citri*. Se registró que el 30% de las ninfas fueron parasitadas por este insecto en los meses de junio y julio en los dos años de estudio.

En Florida, EUA se introdujo al parasitoide *T. radiata* para el control biológico de *D. citri* y se observó su establecimiento en el Este del mismo estado (Hoy *et al.*, 1999), posteriormente se implementó un programa de manejo integrado para el control del psílido en otros estados y se liberaron cientos de parasitoides en todas las áreas citrícolas de EUA, los resultados han sido favorables ya que el parasitismo llegó al 56% además de establecerse muchas zonas citrícolas de EUA. (Qureshi, 2009). Barr *et al.* (2009) mencionan que posiblemente *T. radiata* se haya introducido a México de manera no intencionada. Por ello, es importante realizar más estudios sobre el parasitoide de *Tamarixia* sp. encontrado en Limón Persa.

### 1.4 Conclusiones

El psílido asiático de los cítricos está presente durante todo el año en el sitio de muestreo, las variaciones poblacionales parecen estar asociadas de manera inversamente proporcional a la precipitación pluvial y de manera

proporcional directa a la presencia de brotes tiernos en los que se encuentran los requerimientos nutritivos óptimos para desarrollo del psílido.

El conocimiento generado aquí acerca de esta plaga introducida, en primer término nos indica que ésta ya está adaptada a las condiciones de México. Por tal motivo se requiere de continuar con más estudios para establecer estrategias de control en breve y sobre todo para prevenir la enfermedad de “huanglongbing” que está asociada a este vector.

La detección de enemigos naturales, nos permite pensar que se ha iniciado un proceso de ensamble ecológico, de tal manera que se espera que suceda algo similar con lo ocurrido con el minador de los cítricos, en el que Bautista *et al.* (1998) menciona que a los 3 años de introducida esta plaga exótica se estableció un ensamble en donde además de fauna nativa benéfica, varios parasitoides nuevos se vieron involucrados, resultando así un control biológico natural que actualmente tiene a este minador en poblaciones reducidas.

*Tamarixia* sp. es un parasitoide de ninfas que demostró tener la capacidad de reducir de manera significativa el número de ninfas del psílido y el cual puede ser un agente de control biológico importante.

### **1.5 Literatura citada.**

- Ahmed, S., N. Ahmad y R. R. Khan. 2004. Studies on population dynamics and chemical control of citrus psylla, *Diaphorina citri*. Int. J. Agri. Biol. 6(6): 970-973
- Bautista, M. N., S. J. L. Carrillo; M. H. Bravo y D. S. Koch. 1998. Natural parasitism of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) at Cuitlahuac, Veracruz, México. Florida Entomologist. 81 (1). 30-37.
- Barr. N. B., D. G. Hall; A. A. Weathersbee III; R. Nguyen; P. Stansly; J. A. Qureshi y D. Flores. 2009. Comparison of laboratory colonies and field populations of *Tamarixia radiata*, an ectoparasitoid of the Asian citrus psyllid, using internal transcribed spacer and cytochrome oxidasa subunit I DNA sequences. Journal Economic Entomology, 102 (6): 2325-2332
- Bhagat, K. C. y R. K. Nehru. 2005. Screening of sweet orange cultivars against Asian citrus psylla, *Diaphorina citri*. Ann. Pl. Protec. Sci., 13(1) 213-269.

- Brlansky, R. H., K.R. Chung; y M. E. Rogers. 2007. Florida Citrus Pest Management Guide: Huanglongbing (Citrus Greening). University of Florida 225 pp.
- Catling, H. D. 1970. Distribution of the psyllid vectors of citrus greening disease with notes on the biology and bionomics of *Diaphorina citri* FAO Plant Protection Bulletin, 18: 8-15.
- Coronado, B. J. y C.E. Ruíz. Registro del Psílido de los cítricos *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) para México. Folia Entomológica Mexicana, 43(1):165-166.
- Chien, C. C., Y. I. Chu y H.C. Ku. 1991. Biological control of citrus psyllid, *Diaphorina citri* in Taiwan. Chinese Journal of Entomology, 11(1): 25-38.
- da Graça, J. V. 2008. Biology, history and World Status of Huanglongbing. Memorias del Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos. Hermosillo, Sonora. pág: 1 -7.
- FAO. 2003. Examen de los problemas fitosanitarios actuales relacionados con los cítricos y de las políticas aplicadas para afrontarlos.[En línea] <http://www.fao.org/DOCREP/MEETING/006/y9061s.htm> (Revisado en enero de 2010).
- Flores, D., G. D. Hall; A. D. Jenkis y M. Setamou. 2009. Abundance of Asian citrus psyllid on Yellow sticky traps in Florida, Puerto Rico and Texas citrus groves. Southwestern Entomologist, 34(1):1 -11.
- Hall, G. D. 2008. Biology, history and world status of *Diaphorina citri*. Pp. 1-11. In: I Workshop on Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter* spp) and the Asian Citrus Psyllid (*Diaphorina citri*). 7-9/V/2008. Hermosillo, México.
- Hall, G. D., G. M. Hentz; y C. R. Adair Jr. 2008. Population ecology and phenology of *Diaphorina citri* (Hemiptera. Psyllidae) in two Florida citrus groves. Environmental Entomology, 37 (4): 914-924.
- Hoy, M. A., R. Nguyen y A. Jeyaprakash. 1999. Classical biological control of the Asian citrus psylla-release of *Tamarixia radiata*. Citrus Indust. 80: 20-22.
- INAFED. 2005. Enciclopedia de los municipios de México. Instituto Nacional para el federalismo y desarrollo municipal del gobierno del estado de Veracruz. Secretaria de Gobierno. México. [En Línea] [www.e-local.gob.mx](http://www.e-local.gob.mx) (Revisado diciembre de 2009)
- Khan, M. A., M. Agnihotri y N. S. Sushil. 2005. Taxonomics studies of Eulophid parasitoids (Hymenoptera : Chalcidoidea) of India. Pantnagar Journal of Research 2(1) Special supplement 1-230.

- Li W., J. S. Hartung y L. Levy. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiology Methods*, 66(1): 104-115.
- Liu H. Y. y J. H. Tsai. 2000. Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Annals Applied Biology*, 137: 201-206.
- McFarland, D. C y A. M. Hoy. 2001. Survival of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), and its two parasitoids, *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) and *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae), under different relative humidities and temperatura regimes. *Florida Entomologist*, 84 (2): 227-234.
- Meyer M. J., A. M. Hoy y G. D. Boucias. 2007. Morphological and molecular characterization of *Hirsutella* species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95: 101-109.
- Michaud, J. P. 2001. Numerical response of *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae) to infestations of Asian Citrus Psyllid, (Hemiptera: Psyllidae) in Florida. *Florida Entomologist*, 84 (4): 608-614.
- Michaud, J. P. 2003. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. *Biological Control*, 29: 260-269.
- Nakata, T. 2006. Temperature dependent development of the citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea), and the predicted limit of its spread based on overwintering in the nymphal stage in temperate regions Japan. *Applied Entomology Zoology*, 41(3): 383-387.
- Nehru, K. R., C. K. Bhagat y K. Vijay. 2004. Influence of citrus species on development of *Diaphorina citri*. *Ann. Pl. Protec. Sci.*, 12(2): 425-475.
- Pande, Y. D . 1971. Biology of citrus Psyllid *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae). *Israel J. Entomol.*, 5:307-311
- Pluke, W. R., A. Escribano; J. P. Michaud y A. P. Stansly. 2005. Potential impact of lady beetles on *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Puerto Rico. *Florida Entomologist*, 88 (2):123-128.
- Pluke, W. R., J. A. Quresh y A. P. Stansly. 2008. Citrus flushing patterns, *Diaphorina citri* (Hemiptera Psyllidae) populations and parasitism by *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Puerto Rico. *Florida Entomologist*, 91(9): 36-42

- Qureshi, J. A., M. E. Rogers; G. D. Hall y A. P. Stansly. 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.
- SENASICA. (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2009. Notificación de la detección de huanglongbing en el Municipio de Tizimín, Yucatán, Méx. [En Línea] <http://www.senasica.gob.mx/default.asp?doc=9361> (Revisado el 3 de agosto de 2009).
- Shivankar, V. J., C. N. Rao y S. Singh. 2000. Studies on citrus psylla *Diaphorina citri*. *Agricultural Reviews*, 21(3): 26-27
- Tsai, J. H y H. Y. Liu. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on Four Host Plants. *Journal of Economic Entomology*, 93(6):1721-1725.
- Tsai, J. H., J. J. Wang y H. Y. Liu. 2002. Seasonal abundance of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Southern Florida. *Florida Entomologist*, 85(3): 446-451.
- Yamamoto, P. T., P. E. B. Paiva y S. Gravena. 2001. Population dynamics of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) in citrus orchards in the North of Sao Paulo State, Brazil. *Neotropical Entomology*, 30(1):165-170.
- Yang, Y., M. Huang; G. Andrew; C. Beattie; Y Xia; G. Ouyang y J. Xiong. 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.



## Capítulo II. Evaluación de eficacia biológica de productos químicos para el control de *Diaphorina citri* Kuwayama en Limón Persa, Cuitláhuac, Veracruz, México

SÁNCHEZ-BORJA MARICARMEN<sup>1</sup>, BAUTISTA MARTINEZ NESTOR<sup>1</sup>, BRAVO MOJICA HIRAM<sup>1</sup>, ROMERO NÁPOLES JESÚS<sup>1</sup>, RAMÍREZ ALARCÓN SAMUEL<sup>2</sup>, LÓPEZ-MARTÍNEZ VÍCTOR<sup>3</sup>, DE BERNARDI DE LA VEQUIA HÉCTOR<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Edo. de México. 56230. <sup>2</sup>Universidad Autónoma Chapingo Km 38.5 Carretera México-Texcoco. Texcoco, Edo de México. 56230. <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. 62209 México. <sup>4</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba. Km. 348 Carr. Fed. Córdoba-Veracruz. Congregación Manuel León. Amatlán de los Reyes, Ver. 94946

### Resumen

El psílido *Diaphorina citri* Kuwayama se encuentra presente durante todo el ciclo del cultivo del Limón Persa, pero las más altas densidades de ninfas se presentan durante el mes de mayo en el que también se observa la mayor cantidad de brotes tiernos. En esta etapa se evaluó la eficacia de diferentes insecticidas foliares para el control del psílido asiático de los cítricos en el cultivo de Limón Persa en el mes de mayo de 2009. Las aplicaciones se realizaron en campo en una huerta ubicada en Cuitláhuac, Veracruz. Se evaluaron los ingredientes activos disponibles en el mercado atendiendo a las dosis recomendadas. Los ingredientes activos incluidos en este estudio fueron: extractos de origen vegetal, spiromesifen, abamectina e imidacloprid y un testigo absoluto. Se efectuaron cuatro muestreos, uno previo a las aplicaciones y los restantes a las 24 horas, siete, catorce y veintiun días posteriores a las mismas; en cada muestreo se cuantificaron ninfas. El conteo de las ninfas de psílicos fue por brote de 10 cm, ocho brotes por tratamiento con cinco repeticiones. Los tratamientos se iniciaron con un promedio de 45 y 101 ninfas/brote. Los resultados indican una diferencia significativa entre el testigo y los tratamientos evaluados, los insecticidas abamectina e imidacloprid aplicados al follaje reducen significativamente la población de ninfas en el cultivo hasta los veinte días posteriores a la aplicación, proporcionando niveles de control por encima del 90% de eficacia biológica. El spiromesifen también puede ser un producto recomendado para el control de ninfas de *D. citri*, ya que a los 7 y 14 días de haberlo aplicado tuvo un 83 % y 88% de eficacia.

**Palabras clave:** ninfas, insecticidas, control químico, cítricos.

## Abstract

The psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama is present throughout all the crop cycle Limon Persian, but the highest densities of nymphs were present during the month of May which is the time with more shoots. At this stage we evaluated the effectiveness of different foliar insecticides for control of asian citrus psyllid in the cultivation of Persian Limon in May 2009. The applications were made in the field, in an orchard located in Cuitlahuac, Veracruz. We evaluated the active ingredients available in the market at recommended doses. The active ingredients and doses were as follows: extracts of plants, spiromesifen, abamectin and imidacloprid and absolute control. Four surveys were conducted, one prior to the applications and the remaining 24 hours, seven, fourteen and twenty one days after the applications, in each sample were quantified nymphs. The count of the nymphs of psyllids per shoot was evaluated on 8 shoots of 10 cm per treatment, with five replications. The treatments were started with an average of 45 and 101 nymphs/shoot. The results indicated a significant difference between the untreated control and treatments, abamectin and imidacloprid insecticides applied to foliage significantly reduced the population of nymphs in the crop until the twentieth day after application, providing levels of control over 90 % biological efficacy.

**Key words:** *nymphs, insecticides, chemical control, Citrus.*

## 2.1 Introducción

México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial en la producción de Limón Persa por lo que este cultivo es de gran importancia económica. Uno de los principales problemas que enfrenta el cultivo es el ataque de plagas y enfermedades. Una de estas plagas es *Diaphorina citri* quien actualmente está presente en todas las zonas de cultivo de cítricos y en áreas de traspatio. Este insecto causa daños directos en la planta y también es una grave amenaza para la industria cítrica en general, debido a que es vector de la bacteria restringida al floema *Candidatus Liberibacter spp.*, causante del “huanglongbing” o dragón amarillo de los cítricos, una enfermedad muy devastadora, incluso en mayor grado a la causada por el Virus de la Tristeza de los Cítricos (da Graça, 1991; da Graça y Korsten, 2004; Halbert y Manjunath, 2004; Beattie *et al.*, 2008)

Ante esta problemática se han implementado diversas técnicas para combatirla siendo la más común la aplicación de productos químicos. Se han utilizado insecticidas como dimetoato, aldicarb, monocrotofos, deltamethrin, cipermetrina, clorpirifos, diclorvos, endosulfán, malatión con resultados hasta del 90% en la reducción de la plaga por 7 días después de las aplicaciones (Catling, 1970; Bové, 1986; Dahiya *et al.*, 1994); También han aplicado metamidofos, dimetoato, imidacropid, abamectina, Neem (*Azadirachta indica*) y aceites minerales en diferentes variedades de naranja (Weathersbee y Mckenzi, 2001; Sohail *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Srinivasan *et al.*, 2008; Cocco and Marjorie, 2008). En Florida, EUA se recomendó realizar aplicaciones durante el periodo en que se presentan las ninfas y más cuando se detectaron en una planta enferma, ya que al emerger los adultos éstos pueden dispersar la enfermedad inmediatamente al alimentarse de una planta sana (Halbert and Manjunath, 2004).

El uso de plaguicidas ha acarreado enormes beneficios a la agricultura disminuyendo el ataque de plagas y consecuentemente las pérdidas que ocasionan a los cultivos. Sin embargo, la facilidad y efecto rápido de estos productos hace que el hombre los utilice en ocasiones indebidamente, lo cual puede generar nuevos y complejos problemas a la agricultura. Las plagas que atacan al cultivo de limón, constituyen una amenaza para los citricultores,

porque llegan a causar daños económicos e incluso pérdidas totales en cuanto a la producción. Por ello en la presente investigación se evaluó el efecto de cuatro plaguicidas para el control de *Diaphorina citri*. Para proporcionar a los citricultores, alternativas de aplicación y evitar resistencia alcanzando la eficiencia en el control de plagas y resultados óptimos en producción y rentabilidad.

## **2.2 Materiales y métodos**

### **2.2.1 Localización del área de estudio**

La investigación se realizó en Cuitláhuac, Veracruz, en una huerta de limón Persa (18°50' N, 96°55' O, 420 m) con árboles de 7 años de edad. El clima de esta zona es cálido-húmedo con un promedio anual de precipitación de 2612 mm y temperaturas máxima de 36 °C (abril y mayo) y mínima de 12° C (enero). La época de lluvias se presenta de junio a principios de septiembre (INAFED, 2005). Las aplicaciones se realizaron en el mes de mayo de 2009 cuando se presentaron altas infestaciones de *D. citri*.

### **2.2.2 Diseño experimental, aplicación y evaluación de tratamientos.**

El diseño utilizado en campo fue completamente al azar. Se seleccionó un árbol de limón Persa como unidad experimental y se muestrearon 8 brotes de 15 cm, de cada uno de los cuales se cuantificó el número de ninfas presentes, los datos se reportaron en una hoja de campo. En total se realizaron 5 repeticiones por tratamiento.

Para la aplicación de los tratamientos se evaluaron inicialmente el número de ninfas por brote y cada uno se etiquetó, indicando el tratamiento que le correspondió. Esta selección se realizó en forma aleatoria.

Para cada tratamiento se utilizaron los siguientes productos comerciales a diferentes concentraciones (Cuadro 1), éstas se definieron con base a lo recomendado para insectos chupadores.

Cuadro 1. Productos y dosis de aplicación.

Producto	Ingrediente activo	Dosis evaluadas	
Bug clean	Extractos de origen vegetal	1.5mL/ L de agua	2.5mL/ L de agua
Oberon	Spiromesifen	0.6 mL/ L de agua	1.2 mL/ L de agua
Helminfdor	Imidacloprid	0.25 mL/L de agua	0.5mL / L de agua
Protectin	Abamectina	0.25 mL/L de agua	0.5 mL / L de gua
Testigo	Agua	Agua	Agua

Estos productos fueron asperjados sobre el follaje del limón Persa infestado de ninfas, para conocer la eficacia de los mismos y determinar la dosis adecuada para su control. Después de la aplicación se evaluó el porcentaje de eficacia muestreando a las 24 h, 7, 14 y 21 días. Los datos se registraron en una hoja de campo. El conteo se realizó de manera visual, con la ayuda de una lupa que permitió diferenciar las ninfas vivas de las muertas.

### 2.2.3 Análisis de datos

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza y la diferencia de tratamientos fue determinada con la prueba de Tukey, con  $\alpha = 0.05$ . (SAS Institute 1999, Versión 9.1) Para el porcentaje de eficacia se utilizó la fórmula de Abbot (1925).

## 2.3 Resultados y discusión

Antes de la aplicación se observó en promedio de 46 a 101 ninfas por brote sin diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 2). Los resultados de tratamientos se pueden observar en el Cuadro 2, donde se presentan las diferencias significativas entre tratamientos y testigo. Los ingredientes activos de abamectina e imidacloprid en ambas dosis fueron significativamente mejores para el control de ninfas ( $p \leq 0.05$ ), ya que se observó un promedio de 9, 12 y 13 ninfas vivas por brote con 87 y 91% de eficacia biológica después de 24h de aplicación; también el extracto de origen vegetal presentó un promedio de 30 ninfas muertas con 69 % de eficacia. Estos datos concuerdan con Sohail *et al.* (2004), quien menciona que imidacloprid resulta más efectivo significativamente que otros productos como

metamidofós y dimetoato a las 24 h de su aplicación. En este caso también se observó que la abamectina presenta un buen porcentaje de eficacia.

Cuadro 2. Promedio de ninfas por brote y porcentaje de eficacia para cada tratamiento en Limón Persa. Mayo de 2009 en Cuicatláhuac, Ver.

Tratamiento/dosis	C.P.A	24 h	%Ef.	7d	%Ef	14 d	%Ef.	21 d	%Ef.
Extrac.veg 1.5	46a	43b	56	40b	58	37b	61	44b	53
Extrac.veg 2.5	73a	30b	69	24bc	75	22bc	77	34b	64
Spiromesifen0.6	64a	48b	51	30bc	68	27bc	71	45b	52
Spiromesifen1.2	76a	44b	55	16cd	83	12bc	88	35b	63
Abamectina0.25	65a	12c	87	8cd	91	7d	93	32b	66
Abamectina0.5	95a	9c	91	4d	96	6d	94	28b	70
Imidacloprid0.25	69a	13c	87	7d	93	7d	93	32b	66
Imidacloprid0.5	83a	9c	91	4d	95	6d	93	28b	70
Testigo	101a	98a	0	94a	0	96a	0	94a	0

CPA: Conteo Previo a la Aplicación, % Ef= porcentaje de eficacia. Números seguidos de la misma letra en la misma columna, no difieren estadísticamente  $P(\alpha=0.05)$ , según prueba de Tukey.

A los 7 días de aplicación también hubo diferencia significativa entre los tratamientos donde la abamectina con dosis de 0.5 mL/L de agua e imidacloprid en ambas dosis presentó menor promedio de ninfas vivas por brote con un 96, 93 y 95% de eficacia biológica; abamectina en dosis de 0.25 mL/L de agua y spiromesifen en dosis de 1.2 mL/L de agua también tuvieron diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos, con 8 y 16 ninfas vivas por brote y 91 y 83% de eficacia. Estos datos superan a los reportados por Dahiya *et al.* (1994), quienes utilizaron dimetoato, monocrotofos, deltametrina, clorpirifós, endosulfán y malatión los cuales tuvieron un 90% de eficacia.

El spiromesifen también puede ser un producto recomendado para el control de ninfas de *D. citri*, ya que a los 7 y 14 días de haberlo aplicado tuvo un 83 % y 88% de eficacia.

A los 14 días se observó que la diferencia fue significativa para ambas dosis de abamectina e imidacloprid, presentaron menor promedio de 6 y 7 ninfas vivas con 93 y 94% de eficacia biológica. Estos resultados superan a los reportados por Kumar *et al.* (2005), donde cipermetrina y dimetoato e imidacloprid presentaron 91% de efectividad. Sin embargo, profenopós y acefate presentaron un 98 % de eficacia.

A los 21 días no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, la presencia de ninfas vivas se comenzó a incrementar, posiblemente porque los productos disminuyeron su eficacia biológica entre el 70 y 52%; sin embargo, esto nos da un margen para continuar con otras labores, ya que todavía hay un efecto en las ninfas.

Los resultados muestran que los ingredientes activos como abamectina e imidacloprid son los más recomendados en caso de presentarse altas densidades de población de ninfas, y son importantes para tomarse en cuenta en un programa de manejo integrado. Los extractos vegetales y el spiromesifen pueden también recomendarse para un manejo integrado pero cuando las infestaciones son bajas. En campo se observó que estos productos afectaron en mayor parte ninfas de primer y segundo instar ninfal de *D. citri*, por lo que se recomendarían aplicar cuando se requiera manejar organismos benéficos pues contribuirían a que las etapas no atacadas por parasitoides tengan cierto manejo.

## **2.4 Conclusiones**

Los insecticidas abamectina e imidacloprid aplicados al follaje reducen significativamente la población de ninfas en el cultivo de limón Persa hasta los veinte días posteriores a la aplicación del insecticida, proporcionando niveles de control por encima del 80%. El spiromesifen también puede ser un producto recomendado para el control de ninfas de *D. citri*, ya que a los 7 y 14 días de haberlo aplicado tuvo un 83 y 88% de eficacia, respectivamente; por otro lado los extractos de origen vegetal se muestran eficaces entre un 70 a 80% hasta los 7 días posteriores a la aplicación. En el testigo no se observó alguna regulación natural por enemigos naturales.

## **2.5 Literatura citada**

Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J.Econ. Entomol., 18: 265-267.

Beattie, A., P. Holford; D. J. Mabblerley; A. M. Haigh y P. Broadbent. 2008. On the origins of *Citrus*, Huanglongbing, *Diaphorina citri* and *Trioza erytrea*, pp.25-57. In: Proceedings of the International Research Conference on

- Huanglongbing. Abstract 11.8. USDA, University of Florida. Orlando, Florida.
- Bové, J. M. 1986. Greening in the Arabian Peninsula. Toward New Techniques for its detection and control. *FAO Plant Protection. Bulletin*, 34(1): 7-15.
- Catling, H. D. 1970. Distribution of the psyllid vectors of citrus greening disease with notes on the biology and bionomics of *Diaphorina citri*. *FAO Plant Protection Bulletin*, 18: 8-15.
- Cocco A. y M. Hoy. 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.
- Dahiya, K. K., R. K. Lakra, A. S. Dahiya y S. P. Singh. 1994. Bioefficacy of some insecticides against citrus psylla. *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Crop Res. Hisar, India* 8:137-140.
- da Graça, J. V. 1991. Citrus greening disease. *Annu. Rev. Phytopathology*, 19:109-136.
- da Graça, J.V., y L. Korsten. 2004. Citrus huanglongbing: Review, present status and future strategies, p. 229-245. *In: S.A.M.H. Naqvi (ed.) Diseases of fruits and vegetables, Vol. 1. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.*
- Halbert, E. S y , L. K. Manjunath. 2004. Asian citrus psyllids (Stenorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist*, 98(4):387-396.
- INAFED.2005. Enciclopedia de los municipios de México. Instituto Nacional para el federalismo y desarrollo municipal del gobierno del estado de Veracruz. Secretaria de Gobierno. México. [www.e-local.gob.mx](http://www.e-local.gob.mx)
- Kumar, P., H. M. Singh y Singh, A. K. 2005. Evaluation of insecticides and seed Kernel extracts against Citrus Psylla, *Diaphorina citri*. *Ann. Pl. Protect. Sci.*, 13(2): 478-480.
- Sohail, A., A. Nisar, y R. K. Rasah. 2004. Studies on Poblacion Dymanics and Chemical Control of Citrus Psylla, *Diaphorina citri*. *International Journal Agriculture & Biology*. 6 (6):970-973.
- Srinivasan, R. M. A., M. Hoy; R. Singh y M. E. Rogers. 2008. Laboratory and field evaluations of Silwet L-77 and kinetic alone and in combination with imidacloprid and abamectin for the management of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist*, 91:87-100.



- Weathersbee III, A. A. y C. L. Mckenzie. 2001. Efect of a neem biopesticide on repellency, mortality, oviposition, and development of *Diaphorina citri* Homoptera: Psyllidae. Florida Entomologist, 88(4): 401-407.
- Yang, Y., M. Huang; G. Andrew; C. Beattie; Y. Xia; G. Ouyang y J. Xiong. 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.

### **Capítulo III. Diagnóstico de muestras con síntomas semejantes a la enfermedad de Huanglongbing en Limón Persa, (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Sweet cv. 'Tahiti'), en Cuitláhuac, Veracruz**

SÁNCHEZ–BORJA MARICARMEN<sup>1</sup>, BAUTISTA MARTINEZ NESTOR<sup>1</sup>, BRAVO MOJICA HIRAM<sup>1</sup>, ROMERO NÁPOLES JESÚS<sup>1</sup>, RAMÍREZ ALARCÓN SAMUEL<sup>2</sup>, LÓPEZ-MARTÍNEZ VICTOR<sup>3</sup>, DE BERNARDI DE LA VEQUIA HÉCTOR<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Edo. de México. 56230. <sup>2</sup>Universidad Autónoma Chapingo Km 38.5 Carretera México-Texcoco. Texcoco, Edo de México. . 56230. <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. 62209 México. <sup>4</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba. Km. 348 Carr. Fed. Córdoba-Veracruz. Congregación Manuel León. Amatlán de los Reyes, Ver. 94946

#### **Resumen**

La enfermedad de Huanglongbing (HLB) es devastadora, aunque hasta el momento no se ha detectado en la zona de Cuitláhuac, Veracruz; sin embargo, su detección es difícil debido a que los síntomas son muy parecidos a las deficiencias nutricionales o por daños provocados por otras enfermedades, e incluso por insectos; por ello en la presente investigación se realizó un análisis completo de nutrición en muestras de material vegetal de limón Persa con "síntomas semejantes" a HLB y se realizó el diagnóstico por medio de PCR para comprobar la presencia o ausencia de HLB. Los resultados obtenidos indican que el material colectado presentó deficiencias nutrimentales y no se detectó la presencia del patógeno causante de la enfermedad HLB.

**Palabras clave:** deficiencias de micronutrientes, PCR , *Candidatus Liberibacter* spp.

## **Abstract**

Huanglongbing is a devastating disease, so far has not been detected in the area of Cuitlahuac, Veracruz; but its detection is difficult because the symptoms are very similar to nutritional deficiencies or for damage caused by other diseases and even insects, so in the present investigation was carried out a complete analysis of nutrition in samples of plant material Persian lime with “symptoms of HLB”. The diagnosis was made by PCR for the presence or absence of HLB. The results indicate that the material collected presented nutritional deficiencies and could not find the presence of the pathogen causing the disease HLB

**Key words:** deficiencies of micronutrients, PCR, *Candidatus Liberibacter* spp.

### 3.1 Introducción

La citricultura en México representa económicamente una producción de 6.7 millones de toneladas anuales, con un valor de 8,050 millones de pesos (Robles y Delgadillo, 2010) y existe un beneficio de más de 67 mil productores; existen 526 mil hectáreas establecidas y distribuidas en 23 entidades federativas. El cultivo de limón persa genera muchas divisas, debido a que es producto principalmente de exportación; donde México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial.

La enfermedad de Huanglongbing (HLB) representa una seria amenaza debido a que se considera como una de las enfermedades que afecta a los cítricos en el mundo, debido a la severidad de los síntomas, la rapidez con que se propaga y además porque todas las variedades comerciales son susceptibles. El HLB ha afectado gravemente la producción de cítricos en diferentes países de Asia, África, Subcontinente Indio, Península Arábiga, Brasil (Sao Paulo) y EUA (Carolina del Sur, Florida, Georgia, Luisiana y Orleans y Washington), Puerto Rico y Cuba causando grandes pérdidas económicas. En México se ha reportado en los municipios de Yucatán (Tizimin y Lázaro Cárdenas), Quintana Roo (Calakmul), Campeche y Colima (Tecomán), la detección se ha observado en plantas de traspatio, limón mexicano y limón Persa (SENASICA, 2010; Robles y Delgadillo, 2010).

Esta enfermedad es causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter* gram negativa conocida como, con las especies *C. Liberibacter asiaticus* (presente en Asia y América), *C. Liberibacter americanus* (presente en Brasil) y *C. Liberibacter africanus* (presente en África); esta bacteria se aloja en el floema de la planta de aproximadamente 20 géneros de las rutáceas. Algunos autores mencionan que la enfermedad se expresa de forma más severa en naranja dulce (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck), mandarinas (*Citrus reticulata* Blanco) y tangelos; moderado en toronjas (*Citrus grandis* [L.] Osbeck), limones (*Citrus limon* [L.] Burm) y naranja agria (*Citrus aurantium* L.), y menos dañino en lima mexicana (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle) y pomelo (*Citrus paradisi* Macfad); sin embargo, se han encontrado reportes de daños importantes en los cultivares donde se producen estos cítricos en el mundo

(INISAV, 1999). Para el caso de México, la presencia de síntomas ha sido principalmente en árboles de traspatio de lima mexicana (*Citrus aurantifolia*), en lima persa (*Citrus latifolia*) y naranja dulce (*Citrus sinensis*) (Gómez, 2008; Robles y Delgadillo, 2010).

La enfermedad de HLB en un inicio es difícil de reconocer porque es similar a la deficiencia de nutrientes o a otras enfermedades de la planta, por ello se ha realizado la prueba convencional de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Hocquellet *et al.*, 1999; Hung *et al.*, 2004; Jagoueix *et al.*, 1996; Texeira *et al.*, 2005a; Texeira *et al.*, 2005b; Tian *et al.*, 1996). Debido a la importancia de la detección de esta enfermedad y a la sintomatología inicial similar a la falta de nutrientes en plantas; en la presente investigación se realizaron análisis de nutrición en muestras vegetales de limón persa, así como pruebas de diagnóstico por el método de PCR convencional para la posible presencia de HLB en limón Persa en Cuitláhuac, Veracruz.

## **3.2 Materiales y métodos**

### **3.2.1 Localización del área de estudio**

La colecta del material vegetativo se realizó en junio de 2007 en Cuitláhuac, Veracruz, en una huerta de limón Persa (18°50' N, 96°55' O, 420 m) con árboles de 7 años de edad y sin aplicación de plaguicidas. El clima de esta zona es cálido –húmedo con un promedio anual de precipitación de 2612 mm y temperatura máxima de 36 °C (abril y mayo) y mínima de 12° C (enero). La época de lluvia se presenta en junio y a principios de septiembre (INAFED, 2005).

### **3.2.2 Colecta de muestras para análisis de nutrientes**

Se colectaron 12 muestras de material vegetativo que no presentaron daño físico químico o biológico; en este caso hojas con síntomas de deficiencia nutricional y con posible presencia de HLB (hojas jóvenes y maduras). De cada planta se tomaron 4 hojas, tomando en cuenta cada punto cardinal y se completaron 16 hojas de cada árbol. Se colocaron en bolsas de papel y se transportaron en una hielera con gel para mantenerlos a temperatura de -5°C hasta su ingreso al laboratorio.

### 3.2.3 Procesamiento de muestras para análisis de nutrientes

Se realizó el análisis completo de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn y Cu) de acuerdo a la metodología recomendada por Alcantar y Sandoval (1999) el procesamiento de las muestras se llevó a cabo en los laboratorios generales de fruticultura y química de suelos del Campus Montecillo en el Colegio de Posgraduados.

Las muestras del material vegetal se secaron en estufa durante 72 h a 70°C; después se molieron, hasta que las muestras quedaran homogéneas, se realizó una repetición de cada muestra.

#### 3.2.3.1 Nitrógeno total (Método Kjeldahl)

Para la obtención del nitrógeno total se tomó 0.1 g de la muestra molida; éste se depositó en matraz de digestión de 30 mL, se le agregó 1.5 mL de mezcla diácida (ácido sulfúrico y salicílico), se sometió en una estufa de digestión a 300 °C durante 3 h aproximadamente, hasta que se obtuvo un extracto (digerido) de color verde claro transparente y cristalino; al término de la digestión se le agregaron 10 mL de agua destilada y se pasó al destilador donde se agregaron 14mL de NaOH al 50%. El destilado se colectó en un matraz que contenía 5 gotas de indicador (verde bromocresol más rojo de metilo) y 20 mL de ácido bórico al 4%, hasta obtener 50 mL virando a una coloración azul pálido. La titulación de la solución extraída se realizó con ácido sulfúrico 0.049 N que al mezclarse con el destilado viró a un color rosado; cuantificándose el gasto del ácido para realizar los cálculos con la siguiente ecuación

$$\% \text{ N} = \frac{\text{volumen gastado del ácido} \times \text{Normalidad del } \text{H}_2\text{SO}_4 \times 14}{\text{peso de la muestra}}$$

La concentración obtenida se transformó en miligramos de N por gramo de materia seca, con lo que se obtuvo el contenido total.

### **3.2.3.2 Fósforo (Método del Vanadato – Molibdato Amarillo)**

En el caso de fósforo total se pesaron 0.5 g de muestra seca, la cual se colocó en un matraz de digestión de 30 mL, se adicionó 10 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado y se dejó reposar toda la noche. Posteriormente se agregaron 3.5 mL de la mezcla de ácido perclórico mas ácido sulfúrico. Se colocaron en la plancha de arena para que se llevara a cabo la digestión y se sacaron cuando la solución tomó una coloración cristalina y un volumen aproximado de 2 mL; se dejaron enfriar y se agregaron 10 mL de agua destilada. Posteriormente se realizó la lectura en un espectrofotómetro.

Los cálculos se realizaron de la siguiente forma:

% de P= absorbancia x volumen de digestión x volumen de dilución/  
peso de la muestra en µg x alícuota.

El contenido total se obtuvo al multiplicar la concentración en mg de P por gramo de materia seca por el peso total.

### **3.2.3.3 Potasio (Emisión de llama flamometría)**

Para la determinación del potasio se tomó 1 mL de filtrado de la digestión ya indicada para fósforo y se colocó en un matraz volumétrico de 25 mL y se aforó a dicho volumen. Se agitó y se tomó la lectura en el flamómetro (Alcantar y Sandoval, 1999).

Los cálculos se realizaron:

% K= mg kg<sup>-1</sup> de K x volumen de digestión x volumen de dilución /  
peso de la muestra en µg x alícuota de filtrado.

Estos datos obtenidos en por ciento se transforman a mg g<sup>-1</sup> para obtener el contenido total de K por órgano en función del peso total requerido.

### **3.2.3.4 Calcio y Magnesio (absorción atómica)**

De la solución obtenida después de la digestión se transfirieron alícuotas de 1 mL a matraces volumétricos de 25 mL que se aforaron con agua destilada;

luego se hizo una segunda dilución 10 mL. Antes de llevar a cabo esta última dilución, se adicionó 1 mL de solución concentrada por cada 10 mL. Se mezcló bien y se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro de absorción atómica.

Los cálculos para Ca y Mg se realizaron con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Ca} = \text{mg kg}^{-1} \text{ de Ca} \times \text{Volumen de digestión} \times \text{volumen de dilución} \times 100 / \text{peso de la muestra por alícuota}$$

### **3.2.3.5 Zinc, Manganeso, Fierro y Cobre (Absorción atómica)**

Se filtró y aforó a 25 mL la solución proveniente de la digestión húmeda y se procedió a leer directamente la concentración de Zn, Mn, Fe y Cu en el espectrofotómetro de absorción atómica.

Los cálculos para estos nutrientes se realizaron con la siguiente fórmula:

$$\text{Mg g}^{-1} \text{ Zn, Mn, Fe y Cu} = \text{Volumen de digestión} / \text{Peso de la muestra (g)}$$

### **3.3 Diagnóstico de HLB.**

Para el diagnóstico de la presencia de HLB; se colectaron muestras de material vegetativo de los mismos árboles donde se tomaron muestras para el análisis de nutrición. Se colectaron brotes jóvenes y maduros de plantas aparentemente sanas y con "síntomas" de amarillamiento y decoloración en la venación de la hoja como lo mencionan Floyd y Krass (2006).

El síntoma inicial, que se observó fue de color amarillo claro en las áreas verdes dando la apariencia de manchones, esto es parecido a daños causados por la deficiencia de zinc, calcio o nitrógeno (Figura 5).

Se colectaron 4 hojas, una de cada punto cardinal de los estratos y se completaron 16 hojas de cada árbol. Posteriormente, éstas se colocaron en bolsas de polietileno y se transportaron en una hielera con gel para mantenerlos a temperatura de -5°C, inmediatamente fueron llevados al



laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas en el Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados.

### **3.3.1 Extracción de DNA**

Para llevar a cabo el diagnóstico de presencia o ausencia de HLB. Se realizó la extracción de DNA empleando el protocolo de Bainbridge *et al.* (1990), modificado por Cámara (2001).

Del total de hojas colectadas se tomaron cinco hojas, las cuales se colocaron en hipoclorito al 1%, se dejaron reposar durante 4 minutos y después se enjuagaron sumergiéndolas durante un minuto en agua destilada; en seguida se colocaron en un mortero previamente desinfectado al cual se le agregó nitrógeno líquido y se comenzó a macerar el contenido de hojas; una vez que el material quedó macerado; se tomaron aproximadamente 2 gramos de muestra y se colocaron en tubos Eppendorf de 2 mL de capacidad, a los que se les agregó 600  $\mu\text{L}$  de solución de lisis (10 mM tris base\_ HCl pH8; 250 mM EDTA 2 H<sub>2</sub>O pH8, proteinasa K (sigma), 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , Triton x 100. 0.5%); se incubaron a 80°C por una hora y media. Posteriormente se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de NaCl 1.5 M, 700  $\mu\text{L}$  de fenol equilibrado y 300  $\mu\text{L}$  de cloroformo. Se mezclaron por inversión de tubos para después centrifugar por 20 minutos a 10 000 g. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo cuidando de no tomar la interfase, al cual se le agregaron 1 mL de cloroformo y se mezclaron por inversión de tubos. Se centrifugó por 10 minutos a 10,000 g. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le agregaron 600  $\mu\text{L}$  de etanol. Posteriormente se dejó reposar hasta el siguiente día en refrigeración a 4°C para que se precipitara el DNA; al día siguiente los tubos se centrifugaron durante 20 minutos. Se formó una pastilla y el sobrenadante se decantó cuidadosamente. La pastilla que quedó se lavó con isopropanol al 70%, se centrifugó por 3 minutos, se decantó el isopropanol cuidando de no perder la pastilla. Se dejó secar la pastilla por 30 minutos a 37°C por inversión de tubos. Se disolvió el DNA agregando 80  $\mu\text{L}$  de EB kit de Quiagen. Una vez realizada la extracción, se analizó la presencia de DNA por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Finalmente, el gel se tiñó con Bromuro de etidio y la

presencia de DNA se registró con un fotodocumentador Gene wizard. El DNA se almacenó a -20°C.

### 3.3.2 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR) convencional.

Para examinar la presencia o ausencia del patógeno en las muestras de material vegetativo de limón Persa; se amplificó el DNA con 3 pares de iniciadores diferentes. Para *Candidatus Liberibacter asiaticus*, se utilizó OI1 (5'-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3') y OI2c (5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3'); *Candidatus Liberibacter americanus* GB1 (5' AAGTCGAGCGAGTACGCAAGTACT 3') y GB5 (5' CTATATTTGCCATCAAGTTTAAGTTTTTACCTAGATGTTGG 3') y para ambas *Candidatus Liberibacter asiaticus* y *americanus* A2(5'-TATAAAGGTTGACCTTTTCGAGTTT-3') y J5 (5' -ACAAAAGCAGAAATAGCAGCAACAA-3') específicos para HLB (Das, 2004; Texeira *et al.*, 2005<sup>a</sup>; Texeira *et al.*, 2005<sup>b</sup>; Li *et al.*, 2006; Jagoueix *et al.*, 1996; Ruangwong y Akarapisan, 2006) las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC100 (M.J. Research) bajo las siguientes condiciones: ciclo 1, 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 62° por 30s; 72°C por 1 minuto, continuando la extensión de 72°C por 10 minutos por último -4°C forever (Floyd y Krass, 2006).

### 3.3.3 Preparación de la mezcla PCR

Se utilizaron las reacciones de PCR, en cada reacción se incluyó la cantidad de los siguientes reactivos: dNTP 1.5 µL, MgCl<sub>2</sub> 2.0 µL, H<sub>2</sub>O 12.8 µL, PCR Buffer 2.5 µL, por cada juego de iniciadores se agregó 0.5 µL; enzima taq DNA 0.2 µL, y 5 µL de la muestra de DNA, en total fueron 25 µL por reacción.

Una vez obtenidos los productos de PCR de las muestras, se analizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%. En TAE 1X. Finalmente el gel se tiñó con Bromuro de etidio y se registró con un fotodocumentador.

### 3.4 Resultados y discusión

#### 3.4.1 Análisis de nutrientes

Los resultados del análisis de contenido nutrimental en muestras de limón Persa se muestran en el Cuadro 3, cabe indicar que los resultados, se interpretaron mediante la técnica de Kenworthy utilizando intervalos de concentración para limón Persa propuestos por Benton, et al. (1991), mismos que se pueden observar en el Cuadro 4.

Cuadro 3. Resultados del análisis de contenido nutrimental en limón Persa en Cuitláhuac, Veracruz.

Muestras	N	P	K	Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn
1	2.53	0.09	0.50	0.84	0.30	0.00	135.75	40.00	17.75
2	2.31	0.09	0.67	1.01	0.25	0.00	185.50	26.50	16.75
3	2.56	0.10	0.59	0.82	0.31	0.00	111.50	11.75	14.5
4	2.60	0.09	0.64	0.93	0.28	0.50	116.75	41.00	18.25
5	2.38	0.10	0.65	0.90	0.37	0.25	166.25	22.25	16.25
6	2.49	0.10	0.63	0.63	0.20	0.00	155.25	14.00	16.25
7	2.53	0.10	0.59	0.96	0.31	1.00	142.25	8.50	17.00
8	2.07	0.08	0.54	0.65	0.30	0.00	106.75	2.75	14.00
9	1.92	0.10	0.66	0.66	0.23	0.25	163.75	27.00	20.00
10	1.96	0.08	0.63	0.49	0.20	0.00	102.25	2.25	16.50
11	3.06	0.08	0.61	1.26	0.27	0.00	146.75	13.25	13.50
12	2.53	0.06	2.35	0.58	0.20	0.00	198.00	4.50	11.75

Los resultados fueron obtenidos en porcentaje (%) para N, P, K, Ca y Mg y partes por millón en Cu, Fe, Mn, y Zn.

Los resultados obtenidos en las concentraciones foliares de las muestras indican que el nitrógeno, magnesio y manganeso en la mayoría de las muestras coinciden con lo reportado por Benton *et al.* (1991); para el hierro las concentraciones fueron suficientes en todas la muestras; sin embargo, para fosforo, potasio, calcio, cobre y zinc existen deficiencias nutrimentales de acuerdo con lo reportado por Benton *et al.* (1991).

Brlansky *et al.* (2007) mencionan que muchos de estos síntomas de deficiencias se han detectado en naranja dulce, mandarina, pomelo y en menor proporción en limón; sin embargo, esto no significa que la bacteria no sea capaz de infectar y multiplicarse en los cultivares; al inicio estas deficiencias pueden ser confundidas con síntomas de HLB, donde las hojas pueden ser pequeñas y en posición vertical con una variedad de patrones cloróticos que a

menudo se asemejan con deficiencias de minerales tales como zinc, hierro y manganeso. Timmer *et al.* (2003) mencionan que las deficiencias de zinc son frecuentemente confundidas con los síntomas de HLB; algunas hojas pueden ser de color verde o con solo islas verdes. También puede haber moteados, los cuales se confunden con otras enfermedades como VTC ó túneles de minador. Mc Clean (1970) y Huang (1979) reportan que la detección del patógeno es difícil porque se puede encontrar en bajas concentraciones en los cítricos hospederos.

Cuadro 4. Intervalos de concentración de nutrientes suficientes para limón Persa (Benton *et al.*, 1991).

Elemento	Suficiente
N	2.4-3.0 %
P	0.15- 5.0 %
K	1.60-2.5 %
Ca	1.50-5.0 %
Mg	0.25-1.0 %
Cu	5-100 ppm
Fe	60-200 ppm
Mn	20-200 ppm
Zn	20-200 ppm

En general podemos decir que los árboles muestreados presentaron deficiencias nutrimentales. En las imágenes tomadas de las muestras colectadas se observó un patrón simétrico en general Figura 5.



Figura 5. Hojas de Limón Persa con deficiencia de zinc.

### 3.4.2 Diagnóstico de HLB

Debido a la falta de información con respecto a la relación entre las deficiencias nutrimentales y la sintomatología de las plantas enfermas en México, estas hojas se procesaron para detectar la presencia de HLB para limón persa. El resultado de la extracción de DNA se presenta a continuación.

#### 3.4.2.1 Extracción de DNA

El DNA extraído de las hojas de limón persa se muestra en la Figura 6. Posteriormente al obtenerlo se continuó con el análisis de PCR.

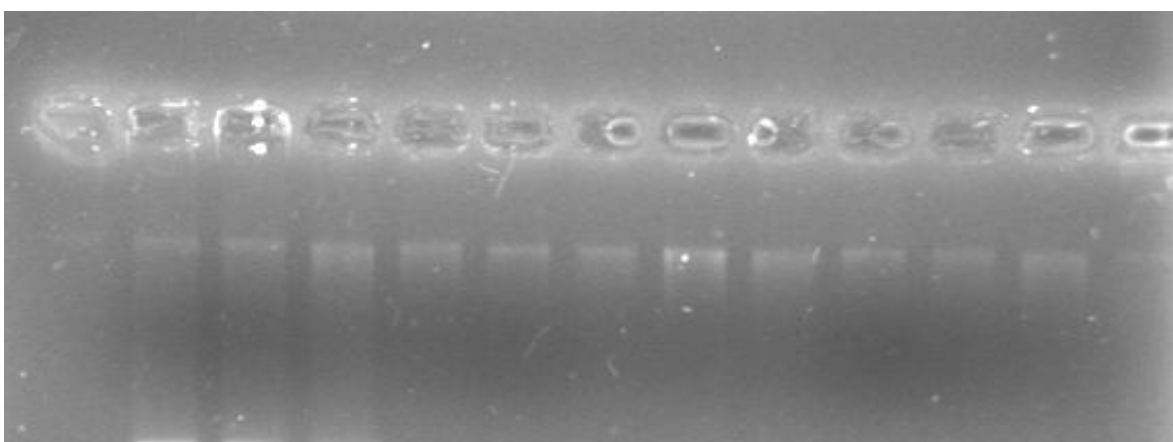


Figura 6. Gel de agarosa al 1% mostrando el DNA extraído de las plantas de limón Persa en Cuitláhuac, Veracruz.

#### 3.4.2.2 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR) convencional.

Mediante el análisis de PRC, no se obtuvo amplificación con ninguno de los iniciadores (Figura 7). Sólo se observan a los lados los pozos con el marcador de bases.

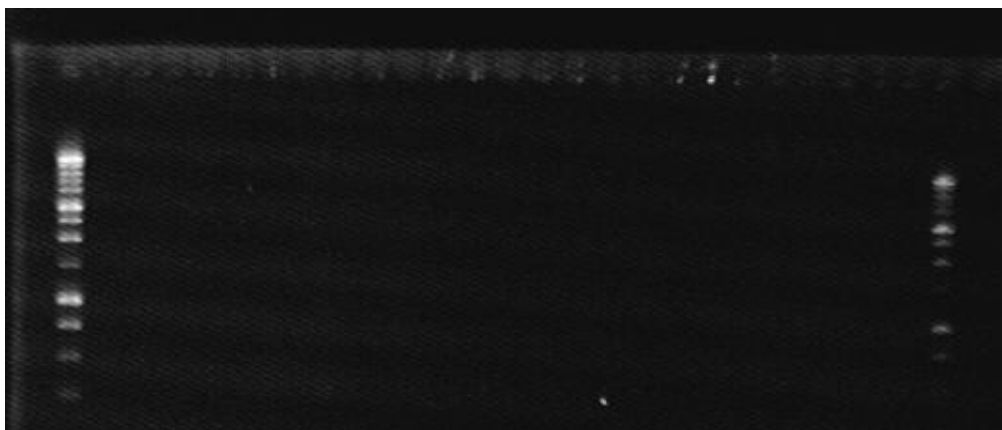


Figura 7. Gel de agarosa 1% donde se amplificó a *Candidatus Liberibacter* sp.

Al no obtener amplificación de los iniciadores para la enfermedad de HLB podemos decir que hasta este momento no se ha presentado la enfermedad en limón persa en la zona de estudio en el municipio de Cuitláhuac, Veracruz.

### 3.5 Conclusiones

Las deficiencias encontradas en material vegetal de Limón Persa fueron fósforo, potasio, calcio, cobre y zinc. Éstas pueden ser confundidas inicialmente con los síntomas de HLB. Sin embargo, en la presente investigación no se encontró la presencia del patógeno *Candidatus Liberibacter asiaticus* ni el patógeno *Candidatus Liberibacter americanus*; por lo que los síntomas que pueden causar confusión se atribuyen, en este caso, a deficiencias de elementos nutricionales.

Es importante mencionar que el hecho de que no se haya encontrado la enfermedad no quiere decir que no haya posibilidad que en un tiempo no muy lejano ésta pueda presentarse en la zona.

Es necesario que los productores y viveristas citrícolas tengan conocimiento sobre la gravedad de esta enfermedad (pues son los más afectados si ésta llegara a ingresar) para comprender el riesgo que se corre ante un ingreso de material de propagación de cítricos por vías que no son las legales.

Las medidas inmediatas a tomar son: capacitar al personal de campo sobre el reconocimiento del insecto transmisor de la enfermedad y de los síntomas que ésta presenta; capacitar a los técnicos en el diagnóstico de la misma y equipar los laboratorios con las inversiones necesarias de equipo, material, insumos y personal para realizar un seguimiento y muestreo con el fin de evitar o disminuir los riesgos de ingreso de esta enfermedad a zonas libres del patógeno.

Se requieren más investigaciones sobre el tema debido a que el patógeno que no se ha encontrado en esta zona. Por consiguiente, es importante prevenir la llegada del patógeno a la zona no transportando material de extraña procedencia o que no sea de viveros certificados, así como realizar inspecciones mensuales para detectar los síntomas en plantas al igual que en *D. citri*.

### **3.6 Agradecimientos**

Agradezco a la Dra. Hilda V. Silva Rojas por la disponibilidad para realizar esta investigación en el laboratorio de biotecnología y patología de semillas y por guiarme en todo momento. También quiero agradecer al Dr. Enrique Becerril y en especial al M. C David Jahen Contreras por permitirme realizar parte de esta investigación en el laboratorio de fruticultura y por haberme guiado en la aplicación de las técnicas de análisis de contenido nutrimental.

### **3.7 Literatura citada.**

- Alcantar , G. G y V. M. Sandoval. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Publicación especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. A. C. Chapingo, México. 156 pp.
- Benton, J.J. Jr., B. Wolf y H. A. Mills.1991. Plant Analysis Handbook. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide. 1991. Micro- macro publishing. Georgia, USA 213 pp.
- Brlansky, R. H., K. R. Chung y M. E. Rogers. 2007. Florida Citrus Pest Management Guide: Huanglongbing (Citrus Greening). University of Florida. 225pp.
- Das, A. K. 2004. Rapid detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing (Greening) Disease using PCR. Current Science, 87(9): 1183-1184.

- Floyd, J. y Krass, C. 2006. New Pest Response Guidelines: Huanglongbing Disease of Citrus. USDA/APHIS/PPQ—Emergency and Domestic Programs, Riverdale, Maryland.[En línea] [[http://www.aphis.usda.gov/import\\_export/plants/ppq\\_manuals.shtml](http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/ppq_manuals.shtml)]. (Revisado el 5 de noviembre de 2006)
- Gómez, H. D. 2008. Experiencias on HLB (Huanglongbing) symptoms detection in Florida. Memorias del taller internacional sobre Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos. Hermosillo Sonora. 1-7 pp
- Hocquellet, A., P. Toowara; J. M. Bové y M. Garnier. 1999. Detection and identification of the two *Candidatus Liberibacter* specie associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of a ribosomal protein gene of the  $\beta$  operon. *Molecular and Cellular Probes*,13:373-379.
- Huang, Ch. 1979. Distribution of likubin pathogen in likubin affected citrus plant. *Journal of Agricultural Research China*, 28:29-33.
- Hung, T. H ., S. C. Hung; C. N. Chen; M. H. Hsu y y H. J Su. 2004. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus* the causing citrus huanglongbing in vector psyllids. Application to the study of vector-pathogen relationships. *Plant Pathol.*, 53:96-102.
- INISAV, 1999. La enfermedad del enverdecimiento de los cítricos y su vector (*Diaphorina citri* Kuwayama). *Boletín Técnico*. La Habana 5(1): 1-53 pp.
- Jagoueix, S., J. M. Bové; y M. Garnier. 1996. PCR detection of the two *Candidatus Liberibacter* species associated with greening disease of citrus. *Mollecular and Cellular Probes*, 10: 42-50.
- Li, W., J. S. Hartung y L. Levy. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiology Methods*, 66(1): 104-115.
- Mc Clean, A. P. D.1970. Greening disease of sweet orange: its transmission in propagative parts and distribution in partially disease trees. *Phytophylactica* 2:263-268.
- Robles, G. L. P. y V. I. Delgadillo. 2010. Manual Técnico para la detección de Huanglongbing de los cítricos.Dirección de protección fitosanitaria, 38pp.
- Ruangwong, O. y A. Akarapisan. 2006. Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Citrus Huanglongbing disease. *Journal of Agricultural Technology* 2(1):111-120
- SENASICA. (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2009. Notificación de la detección de huanglongbing en el Municipio de Tizimín, Yucatán, Méx. [En Línea] <http://www.senasica.gob.mx/default.asp?doc=9361> (Revisado el 3 de agosto de 2009).
- Texeira, D.C., J. L. Danet; S. Eveillard; E. C. Martins; C. W. de Jesus Jr; P. T. Yamamoto; S. A. Lopes; R. B. Bassanezi; A. J. Ayres; C. Saillard y J. M.



- Bové. 2005a. Citrus huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the *Candidatus Liberibacter* species associated with the disease. *Molecular and Cellular Probes*, 19:173-179.
- Texeira, D. C., C. Saillard; S. Eveillard; J. L Danet; I. da Costa; A. J. Ayres y J.M. Bové. 2005b. *Candidatus Liberibacter americanus* associated with citrus huanglongbing (greening disease) in Sao Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55:1857-1862.
- Tian, Y., S. Ke y C. Ke. 1996. Polymerasa chain reaction for detection and quantification of *Liberibacter asiaticum*, the bacterium associated with huanglongbing (greening) of citrus in China. Pages 252-257. In: Proc 13<sup>th</sup> Conf. INT Organ. Citrus Virol. J. V. da Graça, P. Moreno and P. K Yokomi, eds. University California, Riverside.
- Timmer, L.W., S. M. Garnsey y P. Broadbent. 2003. Diseases of Citrus. In: Disease of tropical fruit crops (ed. R. C. Ploetz) APS. Press, USA. 163-195 pp.

#### **4 . Conclusiones generales**

La importancia de este estudio fue contribuir al conocimiento del psílido de los cítricos, donde se encontró en mayor abundancia poblacional, en épocas de sequía, como fueron marzo, abril, mayo, agosto y septiembre. Aunque permanece presente todo el año.

Los enemigos naturales encontrados pueden ser utilizados como una propuesta para el control biológico de esta plaga. Se encontró al parasitoide *Tamarixia* sp. atacando a ninfas en las que se observó un 30% de parasitismo.

La aplicación de productos como abamectina, imidacloprid y spiromesifen contribuyó a la reducción de altas densidades de la plaga con un 83-95% de eficacia biológica, lo que nos permite hacer recomendaciones para su uso en campo mismas que se apoyan en sus características de bajo impacto ambiental.

Es importante intensificar el muestreo para detectar oportunamente la presencia del patógeno debido a que en esta zona hasta el momento no se ha encontrado.

Se recomienda continuar con investigaciones en la zona para generar más conocimiento con respecto a *Diaphorina citri*, evaluar a los enemigos naturales y prevenir la presencia de la enfermedad.