



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**SUPERVIVENCIA Y REPRODUCCIÓN DE *Diaphorina citri*  
Kuwayama (HEMIPTERA: LIVIIDAE) EN PLANTAS DE  
NARANJA Y LIMA MEXICANA SANAS E INFECTADAS CON  
*Candidatus Liberibacter asiaticus*.**

Ana Karen Ramírez Sánchez

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

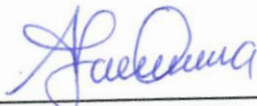
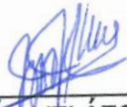

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2016

La presente tesis titulada: SUPERVIVENCIA Y REPRODUCCIÓN DE *Diaphorina citri* Kuwayama (HEMIPTERA: LIVIIDAE) EN PLANTAS DE NARANJA Y LIMA MEXICANA SANAS E INFECTADAS CON *Candidatus Liberibacter asiaticus* realizada por la alumna: Ana Karen Ramírez Sánchez bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA	 _____ DRA. LAURA DELIA ORTEGA ARENAS
ASESOR	 _____ DR. JOSÉ JOAQUÍN VELÁZQUEZ MONREAL
ASESOR	 _____ MC. JORGE MANUEL VALDEZ CARRASCO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mayo de 2016

**SUPERVIVENCIA Y REPRODUCCIÓN DE *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: LIVIIDAE)  
EN PLANTAS DE NARANJA Y LIMA MEXICANA SANAS E INFECTADAS CON  
*Candidatus Liberibacter asiaticus***

**Ana Karen Ramírez-Sánchez**

**Colegio de Postgraduados, 2016, M.C.**

**RESUMEN**

*Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) es una bacteria fastidiosa transmitida por el psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), que causa la enfermedad de huanglongbing (HLB) en cítricos. La bacteria mantiene una asociación compleja con su vector. Para entender mejor estas relaciones y determinar el efecto del patógeno sobre *D. citri*, la supervivencia y reproducción de éste fueron comparadas en plantas de naranja y lima mexicana sanas e infectadas con CLas. Las tablas de supervivencia se construyeron con cohortes de huevos recién puestos y las de reproducción se obtuvieron de 30 hembras por tratamiento. La supervivencia y longevidad de adultos de *D. citri* fue mayor en plantas de naranja (70.75-74.12%) respecto a las criadas en lima (58.5-61.3 %). El tiempo de desarrollo del psílido, de huevo a adulto, se redujo sobre las plantas de naranja infectadas con CLas (15.15 d) en comparación con plantas de lima infectadas y plantas sanas (16.07-17.14 d). En ambos hospederos, la mayor mortalidad (dx) se presentó en huevo (14-30 %); esta última superó la mortalidad acumulada del resto de los estados ninfales (13-18 %). La fecundidad (mx) (633 huevos/ hembra), la tasa neta de reproducción (R0) (221.73 descendientes/ hembra/ generación); la tasa intrínseca de incremento (rm) (0.13 hijas/hembra/d), la tasa infinita de crecimiento ( $\lambda$ ) (1.14 individuos/d) y tiempo de generación (T) (41.03 d) fueron favorables para los psíidos portadores criados en naranja, en comparación con los criados en plantas sanas de ambos hospederos y limas infectadas. Estos resultados sugieren un efecto benéfico de la bacteria para psíidos portadores criados en naranja y una interacción neutral entre la bacteria y los psíidos criados en lima mexicana.

**Palabras clave:** Psílido Asiático de los Cítricos, HLB, interacción, plantas hospederas

**SURVIVAL AND REPRODUCTION OF *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: LIVIIDAE) ON ORANGE AND MEXICAN LIME HEALTHY AND *Candidatus Liberibacter asiaticus* INFECTED PLANTS**

**Ana Karen Ramírez-Sánchez**

**Colegio de Postgraduados, 2016, M.C.**

**ABSTRACT**

*Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) is a fastidious bacteria transmitted by the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), which causes the huanglongbing (HLB) disease in citrus. The bacterium has a complex association with its vector. In order to understand better these relationships and to determine the effect of the pathogen on the vector, the survival and reproduction of *D. citri* were compared on CLas infected and healthy orange and Mexican lime plants. Life tables were constructed starting with cohorts of recently laid eggs and fecundity tables were obtained from 30 females per treatment. The survival and longevity of adults of *D. citri* were greater on orange plants (70.75 - 74.12%) in comparison with Mexican lime plants (58.5-61.3%). Time development of psyllid, from egg to adulthood, was reduced on CLas infected orange plants (15.15 day) compared with infected Mexican lime and healthy plants (16.07-17.14 d). In both hosts, the highest mortality (dx) occurred in egg stage (14-30%), the value exceeded the cumulative mortality of nymphal stage (13-18%). Fecundity (mx) (633 eggs/female), the net rate of reproduction (R0) (221.73 descendants/female/ generation), the intrinsic rate of increase (rm) (0.13 daughters/female/day), the infinite rate of growth ( $\lambda$ ) (1.14 individuals/day) and the generation time (T) (41.03 days) were favorable for carrier psyllids reared on orange compared with infected Mexican lime and healthy plants of both hosts. Results suggest a beneficial effect of CLas on the carrier psyllids reared on orange and a neutral interaction between the bacterium and the psyllids reared on Mexican lime.

**Key words:** Asian Citrus Psyllid, HLB, interaction, host plants

## DEDICATORIA

A mis Padres: **Candelaria Sánchez Pineda y Rodolfo Ramírez González**

Al final de esta etapa de mi vida no encuentro la forma de agradecer todo lo que han hecho por mí. Gracias por darme la vida, por su apoyo incondicional, por sus regaños, por sus sí y sus no; por enseñarme a luchar con razón, por su ejemplo, amor y confianza a ustedes que fueron testigos del camino andado para llegar hasta aquí, y poder convertirme en esa persona de provecho que siempre quisieron.

El logro hoy alcanzado es también de ustedes, resultado de sus esfuerzos sacrificios y el tiempo invertido en mí. Por esto y más. Muchas, muchas gracias. LOS AMO!

A mis Hermanos: **R. Gustavo y J. Antonio Ramírez Sánchez**

Por su apoyo incondicional de ambos, por estar conmigo en las buenas y en las malas en esta etapa de mi vida. A ti Toñito, no sabré nunca como agradecerte todo lo que hiciste por mí, gracias por tu tiempo en estos meses que estuviste conmigo sufriendo en Tecomán, puedo decir que gracias a ti se realizó este trabajo de investigación. Los quiero mucho hermanitos, quiero que sigan logrando sus metas como lo han estado haciendo hasta ahorita. Estoy muy orgullosa de ustedes.

A mi amor **Víctor Sarabia Perea**

La ayuda que me has brindado ha sido sumamente importante, estuviste a mi lado estando tan lejos dándome ánimos en esos momentos y situaciones complicadas. No fue sencillo culminar con éxito este proyecto, eso lo sabemos tu y yo, sin embargo, a pesar de todo lo que ha pasado nunca me dejaste de apoyar, por eso estoy terminando gratificadamente mis estudios, gracias por estar conmigo y por hacerme feliz dándome a la pequeña Victoria, te amo mi amor no lo olvides.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Colegio de Postgraduados** Campus Montecillo por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación personal.

Al **Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT)**, por el subsidio brindado durante la realización de mis estudios.

A la **Dra. Laura Delia Ortega Arenas** por su dirección en la realización de este trabajo durante estos dos años, **su paciencia**, dedicación, su tiempo, consejos y críticas, los cuales me ayudaron a seguir adelante y poder terminar en “tiempo y forma” dicha investigación. Gracias por creer en mí desde el día que me aceptó en el servicio social y siguió confiando aceptándome en la maestría. Y por último mil gracias por dejarme poder vivir esta experiencia que es entrar a la zona de los investigadores.

Al **Dr. José Joaquín Velázquez Monreal** por su apoyo en la parte experimental de esta investigación, por su esfuerzo y tiempo que dedico para poder conseguir todo el material biológico utilizado este trabajo (plantas y más plantas), por sus anécdotas y consejos que me dio durante este proceso en las cuales ya me veía perdida en este trabajo. Por esas convivencias, atenciones y dedicación en la estancia realizada en Tecomán, Colima durante 4 meses.

Al **M. C. Jorge Manuel Valdez Carrasco** por su asesoramiento, contribución y revisión de este trabajo, ayudando así mismo al enriquecimiento del mismo.

Al **Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícola y Pecuaria (INIFAP)** Campo Experimental Tecomán, Colima, por haberme permitido realizar la parte experimental de este trabajo dentro de sus instalaciones.

Al **Dr. Juan Manuel Venegas Rico** por su ayuda, tiempo y paciencia en la parte de resultados de este trabajo.

A **Edgar Eduardo Mendoza García** y **Agustín Jesús Gonzaga Segura** por el apoyo, ánimos y consejos que me dieron en esos momentos de desesperación que tuve durante la maestría, por esas risas y convivencias. Por ser mis mejores amigos.

Al **Sr. Magdaleno Caballero Espinoza** por hacer más ameno el trabajo, sacándome una sonrisa todas las mañanas con sus pláticas y por su apoyo en el mantenimiento de la cría de *Diaphorina citri*.

A mis amigos **Blanca Valdez, Eduardo Cervantes, Alejandro Trigueros, Jesús Alberto, Roberto Brito, Hernán del Villar y Karla Ibarra** por su apoyo y amistad que me dieron para seguir adelante.

Y a todas esas personas que estuvieron en este tiempo conmigo y me ayudaron de forma diferente a poder concluir este trabajo de investigación.

Muchísimas gracias a todos!

# CONTENIDO

	Página
<b>HOJA DE FIRMAS</b>	ii
<b>RESUMEN</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>DEDICATORIA</b>	vi
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	vii
<b>CONTENIDO</b>	viii
<b>LISTA DE CUADROS</b>	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. OBJETIVOS</b>	3
2.1 General	3
2.2 Específicos	3
<b>3. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	4
3.1 Impacto económico de HLB- <i>Diaphorina citri</i> en México	4
3.2 Estrategias de Manejo de <i>D. citri</i> y HLB	5
3.3 Biología y ecología de <i>D. citri</i>	7
3.3.1 Hospederos	8
3.3.2 Daños de <i>D. citri</i> en hospederos	10
3.4 Interacciones biológicas	12
3.4.1 Interacciones planta-patógenos -insectos	13
3.4.2 Interacciones <i>D. citri</i> - cítricos - <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> (CLas)	14
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	17
4.1 Cría de <i>D. citri</i>	17
4.2 Plantas sanas	17
4.3 Plantas enfermas	18
4.4 Ensayos biológicos	18



4.4.1 Supervivencia.	18
4.4.2 Reproducción	20
4.5 Análisis Estadístico	20
<b>5. RESULTADOS</b>	21
<b>6. DISCUSIÓN</b>	27
<b>7. CONCLUSIONES</b>	30
<b>8. LITERATURA CITADA</b>	31

---

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Tiempo de desarrollo y longevidad de <i>D. citri</i> en plantas de naranja y lima mexicana, sanas e infectadas con CLas.	22
2	Tablas de vida de cohortes de <i>Diaphorina citri</i> en plantas de naranja y lima mexicana, sanas e infectadas con CLas.	24
3	Parámetros de crecimiento poblacional de <i>Diaphorina citri</i> en plantas de naranja y lima mexicana, sanas e infectadas con CLas.	26

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Curvas de mortalidad (Log Rank [Mantel-Cox]) de <i>D. citri</i> en plantas de naranja y lima mexicana, sanas e infectadas con CLas.	23
2	Curvas de supervivencia (Log Rank [Mantel-Cox]) de <i>D. citri</i> en plantas de naranja y lima mexicana, sanas e infectadas con CLas.	23
3	Oviposición semanal de hembras de <i>D. citri</i> en plantas de naranja y lima mexicana, sanas e infectadas con CLas.	25

## 1. INTRODUCCIÓN

La transmisión de patógenos de plantas por insectos vectores es un proceso biológico complejo que implica interacciones entre plantas, insectos y patógenos (Purcell, 1982). Dicha interacción puede tener efectos positivos, neutrales o negativos en los vectores (Weintraub y Beanland, 2006). Existen reportes que indican que las tasas de desarrollo, longevidad y fecundidad difiere entre los insectos que se alimentan de plantas infectadas respecto a los que se alimentan de plantas sanas, debido a que la infección del patógeno provoca cambios en el contenido nutricional o la supresión de sustancias de defensa de las plantas (Matthews, 1981; Power, 1992; Luan *et al.* 2013). Por ejemplo, la infección del Aster Yellow Phytoplasma (AYPs), incrementó la fecundidad de la chicharrita *Macrostelus quadrilineatus* (Forbes) y expandió la gama de hospederos de *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott), en comparación a las criadas en plantas sanas (Kingdom y Hogenhout, 2007). En contraste, la exposición del psílido *Cacopsylla melanoneura* Förster a plantas infectadas con *Candidatus* Phytoplasma mali no afectó la supervivencia del insecto pero sí redujo su fecundidad (Malagnini *et al.* 2010). De igual forma, la longevidad de la chicharrita verde *Nephotettix virescens* (Distant) se redujo en plantas de arroz infectadas con el virus del tungro (Saxena y Khan, 1985), lo que fue relacionado con una alta concentración de azúcares y baja concentración de aminoácidos solubles en las plantas enfermas. La fecundidad y esperanza de vida de las mosquitas blancas *Bemisia tabaci* (Gennadius) fueron disminuidas cuando se expusieron a plantas infectadas con el Tomato Yellow Leaf Curl Virus (Czosnek *et al.* 2001). Contrario a ello, la aptitud biológica de la mosca *B. tabaci* fue significativamente mejorada cuando se desarrolló en plantas de tabaco infectadas con el *Tomato Yellow Leaf Curl China Virus*. Dicha respuesta fue asociada con la supresión de la síntesis de terpenoides que median la defensa de la planta (Luan *et al.* 2013; Luan *et al.* 2014).

*Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLas) es una bacteria fastidiosa que causa la enfermedad de huanglongbing (HLB) en cítricos (Bové, 2006; Roossinck, 2011) y es transmitida en forma persistente por el psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). En circunstancias óptimas, los adultos y ninfas de 4°

y 5° instar adquieren la bacteria en 15 minutos de alimentación y de 5 a 7 h son suficientes para la transmisión efectiva del patógeno (Inoue *et al.* 2009; Pelz-Stelinski *et al.* 2010; Luo *et al.* 2015). La bacteria se multiplica en la hemolinfa y glándulas salivales de los psílidos (Pelz-Stelinski *et al.* 2010; Shankar y Abrol, 2012; Grafton-Cardwell *et al.* 2013) por lo que la dispersión del HLB es dependiente de la densidad y movimiento de *D. citri* entre árboles infectados y sanos, así como de la disponibilidad de brotes jóvenes (Tsai *et al.* 2002; Qureshi y Stansly 2008; Ortega-Arenas *et al.* 2013). El vector mantiene una relación estrecha con la bacteria de modo que prefiere alimentarse, al menos inicialmente, de plantas infectadas debido a que éstas liberan volátiles como el salicilato de metilo y D-limoneno que median la preferencia del psílido (Mann *et al.* 2012). Aunque, algunos estudios sugieren también que las poblaciones de *D. citri* portadoras de la bacteria son más susceptibles a insecticidas (Tiwari *et al.* 2011) y hongos entomopatógenos (Orduño-Cruz *et al.* 2015), desventaja que fue correlacionada con un gasto energético por síntesis de esterases y reducción de nutrientes (costo fisiológico), lo cual finalmente afectó la aptitud biológica del insecto.

## 2. OBJETIVOS

Dado que *D. citri* y el HLB están presentes en México (SENASICA, 2016) y las pérdidas a nivel nacional pueden exceder el 50% de la producción citrícola proyectada, lo que representa un fuerte impacto negativo para las unidades productivas (Salcedo et al. 2012) es importante entender las interacciones entre el patógeno (CLas), el vector (*D. citri*) y la planta huésped (cítricos) para determinar las implicaciones que ello tendría en la definición de una estrategia de manejo. Por lo anterior, se plantearon como objetivos:

### 1.2 General

- ❖ Comparar la supervivencia y reproducción de *D. citri* en plantas de lima mexicana var. Colimex y naranja dulce var. Valencia sanas e infectadas con la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) para determinar el efecto de ésta en su vector.

### 1.2 Específicos

- ❖ Determinar la duración de ciclo de vida y las curvas de supervivencia de *D. citri* en plantas de naranja dulce var. Valencia y lima mexicana var. Colimex, sanas e infectadas con CLas.
- ❖ Evaluar la mortalidad, sobrevivencia y esperanza de vida de *D. citri* en plantas de naranja dulce var. Valencia y lima mexicana var. Colimex, sanas e infectadas con CLas.
- ❖ Estimar la tasa neta de reproducción, la tasa intrínseca neta y el tiempo de generación de reproducción natural de *D. citri* en plantas de naranja dulce var. Valencia y lima mexicana var. Colimex, sanas e infectadas con CLas.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Impacto económico de HLB - *Diaphorina citri* en México

Actualmente, la producción de cítricos a nivel global excede las 115 millones de toneladas anuales (Orozco-Santos *et al.* 2014). Solamente en México, el cuarto productor mundial, con una superficie para este cultivo que supera las 555 mil hectáreas, se obtuvieron 6.69 millones de toneladas con un valor estimado en 13,794 MDP (Orozco-Santos *et al.* 2014; SIAP, 2014).

No obstante, la riqueza citrícola del país, dicha industria se encuentra amenazada por patógenos transmitidos por insectos que han acabado con producción de otros países, o han exigido que los gobiernos y productores inviertan grandes sumas de dinero para su manejo. Entre los patógenos que destacan por sus efectos devastadores se encuentran actualmente el virus de la tristeza (VTC) transmitido por pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricida* Kirk.), la leprosis de los cítricos (*Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) transmitida por el ácaro *Brevipalpus* sp. y el huanglongbing (HLB) (*Candidatus Liberibacter* spp.) asociado a *Diaphorina citri* Kuwayama, su vector.

El HLB es una de las enfermedades más destructivas de los cítricos a nivel mundial y responsable de la muerte de millones de árboles (Roistscher, 1996; Halbert y Manjunath, 2004; Bové, 2006). Es un problema que afecta a toda la planta; los síntomas tardan al menos seis meses en manifestarse, inicialmente aparece un brote con amarillamiento en hojas que contrasta con el verde de la planta; los síntomas son más evidentes durante otoño-invierno, observándose amarillamiento y moteado intenso. Los árboles enfermos producen frutos amargos, no aptos para el consumo, deformes y, con el tiempo, mueren. En México el HLB es una enfermedad relativamente reciente, pues los últimos registros indican que se encuentra presente en 391 municipios de 22 de los 24 estados citrícolas del país (SENASICA, 2016).

De acuerdo con las estimaciones oficiales, las pérdidas a nivel nacional pueden exceder el 50% de la producción proyectada, lo que representa un fuerte impacto negativo no sólo para las unidades productivas, sino para los trabajadores que dependen de esta industria como fuente de sustento económico (Salcedo *et al.* 2010;

SENASICA, 2016). Con base a dichos estudios, Veracruz, Colima y Michoacán, se consideran entidades de alto riesgo epidémico y de impacto comercial. Mientras que la Península de Yucatán y la vertiente del Pacífico constituyen regiones de riesgo, pero de relativo bajo impacto económico. Sin embargo, los eventos de 2011 mostraron que la costa del Pacífico se ha vuelto de alto riesgo debido a la alta susceptibilidad del limón mexicano al HLB y *D. citri* (SIAP, 2014). En general, a nivel nacional se verían afectados 69 mil productores, 154 mil empleos directos, alrededor de 60 viveros certificados, 138 empacadoras, 110 enceradoras, 22 plantas jugueras y 5 gajeras las cuales dependen de la citricultura mexicana (Salcedo *et al.* 2011).

### **3.2 Estrategias de Manejo de *D. citri* y HLB**

El HLB es actualmente la amenaza fitosanitaria más importante para la actividad cítrica a nivel mundial, debido principalmente a la complejidad del manejo tanto de la bacteria que la causa como del vector y por las múltiples implicaciones sociales y económicas asociadas. De esta forma, se han planteado algunas estrategias para reducir la dispersión de la enfermedad en los huertos cítricos que se fundamentan en la aplicación de medidas preventivas como el reforzamiento de la vigilancia cuarentenaria para detectar al vector y al HLB, con el fin de enfrentarlos oportunamente empleando medidas como la destrucción de árboles infectados y la erradicación del vector mediante control químico bajo un programa de manejo integrado (Childers *et al.* 2002; Halbert y Manjunath, 2004; Qureshi y Stansly, 2008; SENASICA, 2016).

A raíz de la detección del HLB en Tizimín, Yucatán, en julio de 2009 y como parte de un plan de emergencia para mitigar el riesgo de introducción y dispersión de la enfermedad en México, se estableció la Norma Oficial Emergente, NOM-EM-47-FITO-2009, en la que se determinan las acciones descritas tanto en el “Protocolo de Actuación para la detección del HLB” y como en el “Protocolo de Actuación ante la Emergencia por la Detección del Huanglongbing”, éste último contemplaba actividades de eliminación de plantas positivas a la bacteria, eliminación voluntaria de la planta limonaria (*Murraya paniculata*), control del vector, exploración, delimitación del brote,



muestreo y diagnóstico, así como la capacitación y divulgación. Más tarde, la publicación del Acuerdo en agosto de 2010, respondió a la necesidad de contar con un instrumento jurídico para implementar una estrategia nacional para el manejo y control del HLB, en la que participarán los gobiernos Federal, Estatales y Municipales, así como los tres Sistemas Producto Nacionales involucrados correspondientes a los cítricos dulces (naranja, toronja y mandarina), limón persa y limón mexicano (SENASICA, 2014).

En 2011, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) a través de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) implementó un programa piloto de control de *D. citri*, en los estados de Colima, Michoacán y Yucatán, en el cual se realizó la aplicación de aceites, sales potásicas y productos químicos en una superficie estimada de 20,000 hectáreas (Robles, 2012). Así mismo, el SENASICA junto con investigadores del INIFAP y otras instituciones y técnicos de los Organismos Auxiliares de Sanidad Vegetal (OASV) elaboraron un Protocolo para establecer áreas regionales de control del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos (ARCOs) (Robles, 2012; SENASICA, 2014).

El establecimiento de las ARCOs plantea entre otros objetivos la detección sintomática y asintomática de HLB con el propósito de establecer las medidas fitosanitarias tendientes al control y manejo en las zonas donde se encuentra dicha enfermedad; y de esta manera retrasar y reducir la incidencia de la misma, disminuir la población de psílicos locales, aún en huertos abandonados, reducir los costos de manejo y proteger y conservar los vegetales, productos y subproductos libres del patógeno (Bassanezi, 2010; Robles, 2010; Robles, 2012; SENASICA, 2012).

A la fecha (abril 2016) operan en México 87 ARCOs establecidas en los 24 estados productores de cítricos, logrando cubrir una superficie de 118,954 hectáreas. En éstas se llevaron a cabo aplicaciones regionales totales, la atención de focos de infestación del psílido y el control del vector en 202,157 traspacios de zonas urbanas aledañas a las ARCOs (SENASICA, 2016).

El control genético y productos de nueva generación para el control de la bacteria, así como el esfuerzo de acciones coordinadas entre países por medio de organismos regionales e internacionales como el OIRSA y FAO, son los retos para el

desarrollo de estrategias emergentes en la búsqueda de soluciones a esta importante enfermedad (SENASICA, 2016).

### **3.3 Biología y ecología de *D. citri***

*D. citri* como todos los hemípteros tiene metamorfosis incompleta, por lo que su ciclo biológico comprende una etapa de huevo, cinco estadios ninfales y el adulto. La hembra oviposita en los brotes tiernos, hojas jóvenes y en las axilas de las mismas (Huang *et al.* 1999). El número máximo de huevos por hembra varía de 630 a 1900 dependiendo de las condiciones ambientales y la planta hospedante (Huang, 1990; Chavan y Summanwar, 1993; Liu y Tsai, 2000). Los huevos recién depositados son de color amarillo mate, después adquieren una coloración amarillo naranja y requieren de 2-4 días para completar su maduración. Cuando termina el desarrollo del huevo, éste se rompe por la parte apical que es por donde emerge una ninfa que se mueve por un tiempo corto para seleccionar un punto de alimentación, después se vuelve sedentaria y forman colonias de número variable sobre tejidos tiernos y peciolo (Fonseca *et al.* 2007). Después de que la ninfa comienza a alimentarse, pasa por otras cuatro etapas o instares de desarrollo, en cada caso de mayor tamaño, hasta transformarse en adulto.

Generalmente los adultos están aptos para iniciar el cortejo a las pocas horas después de la emergencia. Pueden vivir varios meses, copulan varias veces y las hembras son más longevas que los machos (Mead, 1977). El ciclo de vida de huevo a adulto puede completarse en dos o tres semanas en climas tropicales, pero puede requerir hasta dos meses en climas fríos (Hodkinson, 2009). Sin embargo, la duración del ciclo de vida del insecto o de alguno de sus estadios ninfales, depende del hospedante donde se desarrollan (Morales *et al.* 2010). La temperatura ambiente es un factor determinante en la tasa de desarrollo de huevos y ninfas de *D. citri*, ya que regula de manera potencial el número de generaciones al año (Hodkinson, 2009). El psílido asiático de los cítricos (PAC) es un insecto muy persistente, y sobrevive a una amplia gama de temperaturas extremas que van desde los 45°C en climas áridos hasta los -7°C en zonas húmedas subtropicales (Aubert y Hua, 1990). De acuerdo con Atwal

*et al.* (1968) el intervalo de temperatura favorable para el desarrollo del psílido varía entre 22 y 29°C. Por su parte Liu y Tsai (2000) y Fung y Chen (2006) reportan un intervalo óptimo de 25-28°C, mientras que temperaturas constantes de 16°C son perjudiciales para los adultos. En la India los adultos pueden vivir 190 días en invierno y sólo 20 días en verano (Chavan y Summanwar, 1993), mientras que en China subtropical el PAC pasa el invierno como imago alargando su desarrollo hasta tres meses y tiene la capacidad de sobrevivir a períodos cortos de frío hasta de -7°C. Fung y Chen (2006) señalaron que la longevidad del adulto de *D. citri* en *M. paniculata* se redujo de 84 días a 20°C a 36 días a 28°C y Liu y Tsai (2000) reportan que a 15°C el desarrollo de huevo hasta adulto se concreta en 49.3 días, mientras que a 28°C se logró en sólo 14 días.

La reproducción del *D. citri* es dependiente de la disponibilidad de brotes jóvenes pequeños u hojas tiernas recién expandidas. Los adultos y ninfas deben alimentarse de brotes tiernos para madurar sus huevos y completar su desarrollo (Tsai *et al.* 2002; Fernández y Miranda, 2005). La producción de brotes es influenciada por el clima, edad, variedad y fenología de la planta (Tsai y Liu, 2000) por lo que la presencia de éstos y en consecuencia la dinámica de población del PAC puede variar entre regiones, esto hace necesario el conocimiento particular de dichas interacciones que den pauta al diseño de estrategias de manejo del insecto y del HLB.

### **3.3.1 Hospederos**

Datos existentes en el Museo Nacional Británico, indican que el hospedante original de *D. citri* probablemente fue una especie de *Murraya*, pero esta plaga se desarrolló rápida y exitosamente en cítricos (Hollis, 1987). Este insecto fue ampliando su gama de hospederos, lo cual le llevó todo un proceso evolutivo en el que intervinieron principalmente la temperatura y precipitación que varían en respuesta a la latitud y altitud del lugar y a la continentalidad. Los compuestos químicos del hospedante han evolucionado por lo que el insecto debe adaptarse, esta coevolución es muy importante para la selección del hospedero (Hodkinson, 2009).

Hoy en día *D. citri* es considerada un organismo polífago, que tiene como hospederos principales a especies del género *Citrus*, especialmente la naranja (*C. sinensis*), limón (*C. limon*) y lima mexicana (*C. aurantifolia*), así como a la planta ornamental *Murraya paniculata* (L.) Jack. (Hollis, 1987). Sin embargo, el tipo de hospedante causa diferentes efectos sobre el psílido, aumentando o disminuyendo sus poblaciones (Tsagkarakis y Rogers, 2008) y en otros el desarrollo es exitoso (Baloch y Ghaffar, 1984).

La reproducción del insecto está determinada por la atracción inicial del hospedante, de su capacidad de ovipositar y de sobrevivir hasta la emergencia del adulto (Aubert y Hua, 1990; Hodkinson, 2009). En este sentido, existen factores que influyen en la preferencia del hospedante tales como la fenología, la cantidad de ceras en la superficie de las hojas, la dureza física del brote, el color de la hoja, la presencia de productos químicos como el cariofileno y bajas concentraciones de repelentes como los compuestos fenólicos o glucosinatos (Moran y Brown, 1973), por lo que el éxito en el desarrollo del psílido varía en función de la susceptibilidad del hospedero. Al respecto, Nava et al. (2007) realizaron estudios en tres hospederos donde encontraron que la viabilidad ninfal fue mayor al desarrollarse en *C. sunki*, en comparación con *M. paniculata* y *C. limonia*. Por otro lado, Tsai y Liu (2000) mostraron que los mejores hospederos fueron *C. paradisi* y *M. paniculata*, pues en éstos la fecundidad y longevidad de *D. citri* fue mayor. Y demostraron con ello la existencia de variaciones en el ciclo de vida y comportamiento reproductivo del psílido, al interactuar en diferentes hospederos (Tsai y Liu, 2000; Fonseca et al. 2007; Nava et al. 2007).

En Asia, *M. paniculata* es el hospedero preferido; *C. aurantifolia* (Christm.) Swingl y *B. koeniggi* son buenos hospederos ya que en ellos el desarrollo del psílido es común; sin embargo, en Filipinas los adultos de *D. citri* fueron atraídos más por *Clausena anisumoleons* Merrill que por *M. paniculata* (Aubert y Hua, 1990). Para México, y en contra de las referencias bibliográficas a nivel mundial que evidencian a las naranja dulce como el hospedero más susceptible, las limas mexicana y persa se presentan como los hospederos preferenciales y en consecuencia con mayor daño causado por el PAC (Salcedo et al. 2010).

Hall *et al.* (2008) mencionan que altas infestaciones de la plaga pueden presentarse en cualquier hospedero cítrico, siempre y cuando existan las condiciones ambientales favorables y haya disponibilidad de brotes (Tsai y Liu, 2000; Medina *et al.* 2007). Al respecto, Tsai *et al.* (2002) al estudiar la dinámica poblacional de *D. citri* en plantaciones de *M. paniculata* y toronja (*C. paradisi* Macfady) encontraron que la abundancia poblacional fue similar en ambos hospederos y señalaron que el crecimiento continuo de los brotes producidos por *M. paniculata* juega un papel importante en mantener altas poblaciones de este insecto cuando no hay disponibilidad de brotes en huertos comerciales de cítricos. En hospederos preferenciales como *C. paradisi* y *C. sinensis* cv 'Marrs' ocurren generalmente mayores poblaciones debido a que presentan sincronía con los periodos de brotación y las hojas de éstos contienen los nutrimentos esenciales que garantizan su supervivencia (Liu y Tsai, 2000 Hall *et al.* 2008; Ortega-Arenas *et al.* 2013). Un alto índice de oviposición en pomelo resulta de la interacción de factores fisiológicos de la planta o factores físicos como la dureza de la hoja, ya que ésta es más ondulada y pubescente que en otras plantas, haciendo a ésta una hospedera más atractiva y adecuada para la oviposición y refugio de los insectos (Moran y Buchan 1975; Tsai y Liu 2000), aunque Wenninger *et al.* (2009) señalan que la calidad de la planta hospedante disminuye a través del tiempo por la alimentación continua de una alta densidad del psílido, inyección de toxinas salivales, presencia de endosimbiontes y/o predisposición genética.

### **3.3.2 Daños de *D. citri***

*D. citri* se alimenta de la savia de las plantas hospederas y como consecuencia de ello causa daños directos produciendo distorsión y alteraciones en el crecimiento de hojas y brotes así como muerte de yemas apicales, afectando de esta manera el desarrollo normal de las plantas. Estos daños se acentúan cuando las poblaciones del insecto son abundantes debido a que pueden matar los brotes nuevos o causar la abscisión de hojas o brotes terminales (Tsai *et al.* 2002). El psílido produce además cantidades importantes de sustancias azucaradas donde se desarrollan los hongos saprófitos que originan 'fumagina' (Aubert, 1987; Chen, 1998; Michaud, 2004). Sin

embargo, el daño principal de *D. citri* es como vector de la bacteria causal del 'greening' o 'huanglongbing' de los cítricos.

El agente causal consistentemente asociado a los síntomas de HLB es una bacteria fastidiosa Gram negativa, perteneciente a la subdivisión alfa de las proteobacterias. Existe en la naturaleza bajo las formas *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *C. L africanus* (CLaf) y *C. L americanum* (CLam), que difieren en su patogenicidad por una combinación de condiciones ambientales e insectos vectores (Bové, 2006).

*D. citri* puede adquirir la bacteria como ninfa o adulto (Yamamoto *et al.* 2006) durante la alimentación (Pelz-Stelinski *et al.* 2010; Ammar *et al.* 2013). Si esto ocurriera en el estado ninfal, los adultos son capaces de transmitirla inmediatamente después de la emergencia (Pelz-Stelinski *et al.* 2010).

El agente causal del HLB inicialmente se observó en las glándulas salivales, cámara de filtración del intestino anterior y dentro de las células del ventrículo e intestino posterior. Recientemente, mediante técnicas moleculares, se ha detectado al patógeno también en el canal alimenticio, tubos de malpighi, hemolinfa, músculos, tejido graso y ovarios de *D. citri* (Ammar *et al.* 2011). Dentro del insecto, la bacteria cruza la pared intestinal hasta llegar a las glándulas salivales vía hemolinfa, lo cual ocurre de 1 a 3 semanas según la virulencia de la cepa (Orozco, 1995; Ramos, 2008).

Estudios previos reportan que la adquisición del patógeno requiere un periodo de 15 minutos a 24 horas y un tiempo de 15 minutos a 7 horas para que el psílido inocule al patógeno (Capoor *et al.* 1974; Buitendag y von Broembsen, 1993). Sin embargo, los resultados hasta ahora son inconsistentes debido a que la eficiencia en la transmisión varía en función del hospedante, patógeno, o ambos (Pelz-Stelinski *et al.* 2010), tiempo de alimentación del insecto, estado de desarrollo y variación genética entre las poblaciones (Almeida *et al.* 2005). De igual manera se indica que el tiempo requerido para que la bacteria circule (latencia), penetre a las glándulas salivales y se multiplique comprende de 1 a 25 días (Xu *et al.* 1988; Roistacher, 1991; Abrol y Shankar, 2012). Inoue *et al.* (2009) señalan que la multiplicación del patógeno solo se lleva a cabo en las ninfas, lo que explica la mayor eficiencia de éstas en la transmisión de la bacteria, en especial las de tercero y cuarto instar (Hung *et al.* 2004). La transmisión de la bacteria está regulada por el efecto de la temperatura y varía de acuerdo a la

localización geográfica (Wang, 2002), susceptibilidad y edad del hospedante (Lopes *et al.* 2009; Tiwari *et al.* 2012), número de insectos infectados (Pelz-Stelinski *et al.* 2010) y la cantidad de bacteria adquirida por el vector (Tiwari *et al.* 2012). Además, Ammar *et al.* (2011) sugieren que el intestino medio y las glándulas salivales actúan como una barrera en la transmisión del patógeno.

Hasta ahora no hay estudios contundentes que confirmen la existencia de transmisión transovárica de la bacteria en *D. citri*. Sin embargo, el hecho de que *Trioza erytreae* y *Bactericera cockerelli* vectores de *Ca. L. africanus* y *Ca. L. psyllaureus/solanacearum*, respectivamente, puedan transmitir las bacterias transováricamente, abre la posibilidad de que *D. citri* lo pueda hacer en el corto plazo. En relación a lo anterior, Mann *et al.* (2011) al realizar apareamientos forzados entre machos infectados y hembras sanas, encontraron que la bacteria se transmite sexualmente de los machos infectados a las hembras sanas, pero no de las hembras infectadas a los machos sanos, sin embargo, las hembras que adquirieron al patógeno durante el apareamiento fueron capaces de transmitir a la bacteria transováricamente. En tanto que Pelz-Stelinski *et al.* (2010) confirmaron haber logrado la transmisión transovárica de *Ca. L. asiaticus* por *D. citri*, aunque a una tasa del 2-6%.

### **3.4 Interacciones biológicas**

Existen múltiples factores bióticos y abióticos involucrados en las interacciones que determinan el éxito o fracaso del desarrollo y establecimiento de una plaga en una región. Entre estos, la temperatura, humedad relativa, precipitación, hospedante (fenotipo, genotipo, fisiología, fotoquímica), enemigos naturales (depredadores, parasitoides, hongos entomopatógenos) y labores agrícolas (poda, fertilización, densidad de plantación) que ejercen influencia directa sobre la densidad poblacional (Aurambout *et al.* 2009).

### 3.4.1 Interacciones planta-patógenos-insectos

Los cambios inducidos por los patógenos en los metabolitos y nutrientes de las plantas pueden provocar alteraciones en sus vectores afectando la biología y la naturaleza de las interacciones entre el hospedero y los vectores de patógenos. Weintraub y Beanland (2006) señalan que la relación entre el patógeno y el insecto vector puede ser benéfica, dañina o neutral en términos de su impacto a la salud del primero. Esto implica que algunos patógenos pueden afectar de forma favorable a los insectos, en tal grado que dichos vectores pueden sobrevivir más tiempo y producir más individuos que aquellos insectos no infectados (Murrall *et al.* 1996; Bealand *et al.* 2000). También es común observar que las plantas infectadas por virus, fitoplasmas, bacterias u hongos están infestadas por insectos, lo que da la impresión de que tales individuos son una mejor fuente de alimento, debido a que los cambios en las características físicas de la planta proporcionan sitios de refugio, sombreados y húmedos, necesarios para algunas especies de insectos vectores (Maramorosch y Koprowski, 1984).

Existen reportes que indican que las tasas de desarrollo, longevidad y fecundidad difieren entre los insectos que se alimentan de plantas enfermas respecto a los que lo hacen en plantas sanas, debido a que la infección del patógeno provoca cambios en el contenido nutricional o la supresión de sustancias de defensa de las plantas (Matthews, 1981; Power, 1992; Luan *et al.* 2013). Al respecto, Hunt y Nault (1990) reportan una mayor supervivencia de la chicharrita *Graminella nigrifrons* (Forbes) cuando se desarrollaron en plantas infectadas con el virus del enanismo clorótico del maíz; así mismo en los estudios por Kingdom y Hogenhout (2007) determinaron que la infección del Aster Yellow Phytoplasma (AYPs), incrementó la fecundidad de la chicharrita *Macrostelus quadrilineatus* (Forbes) y expandió la gama de hospederos de *Dalbulus maidis* (DeLong y Wolcott), en comparación a las criadas en plantas sanas (Kingdom y Hogenhout, 2007). En contraste, la longevidad de la chicharrita verde *Nephotettix virescens* (Distant) se redujo en plantas de arroz infectadas con el virus del tungro (Saxena y Khan, 1985), lo que fue relacionado con una alta concentración de



azúcares y baja concentración de aminoácidos solubles en las plantas enfermas. Similar a ello, la exposición del psílido *Cacopsylla melanoneura* Förster a plantas infectadas con *Candidatus Phytoplasma mali* no afectó la supervivencia del insecto pero sí redujo su fecundidad (Malagnini *et al.* 2010), mientras que en la chicharrita *Amplipcephalus curtulus*, la presencia de *Candidatus Phytoplasma ulmi* (16SrV-A) disminuyó la supervivencia y el número de descendientes, lo cual asociaron con una reducción en el contenido de proteína total y de la actividad de las enzimas desintoxicantes (Arismendi y Carrillo, 2015). La fecundidad y esperanza de vida de las mosquitas blancas *Bemisia tabaci* (Gennadius) fueron disminuidas cuando se expusieron a plantas infectadas con el Tomato Yellow Leaf Curl Virus (Czosnek *et al.* 2001). Contrario a ello, la aptitud biológica de la mosca *B. tabaci* fue significativamente mejorada cuando se desarrolló en plantas de tabaco infectadas con el *Tomato Yellow Leaf Curl China Virus*, esta respuesta fue relacionada con la supresión de la síntesis de terpenoides que median la defensa de la planta (Luan *et al.* 2013, Luan *et al.* 2014).

Los nutrientes en la planta, como se ha mostrado en los reportes anteriores, juegan un papel importante, pues los carbohidratos son la fuente principal de energía y son utilizados en gran parte como componentes del exoesqueleto y las proteínas son esenciales para el desarrollo y reproducción de los insectos (Llanderal, 2000).

#### **3.4.2 Interacciones *D. citri* - cítricos - *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas)**

El agente causal del HLB de los cítricos es una bacteria fastidiosa Gram negativa que se encuentra limitada al floema e invade totalmente a la planta al moverse a través de los poros de los tubos cribosos. El patógeno es un simbiote obligado, ya que necesita de los dos hospedantes (planta y el insecto vector) para dispersarse (Bai *et al.* 2006).

CLas en plantas se considera como un parásito más que un patógeno, ya que causa desbalances metabólicos en el hospedero por reducción de nutrientes o interferencia en la transportación, lo cual resulta en síntomas de HLB (Duan *et al.* 2009). La principal razón de dichos síntomas es el bloqueo del floema causado por el taponamiento de los poros cribosos, a causa de la deposición de grandes cantidades

de calosa y algunas proteínas. La reacción de la planta ante la presencia de la bacteria causa el agotamiento de nutrientes en otras células vecinas, alterando con ello su metabolismo funcional (Trivendi *et al.* 2009).

La sacarosa es generalmente el principal producto del metabolismo del carbono fotosintético y representa, en la mayoría de las plantas, el carbohidrato predominante transportado en los tubos cribosos del floema de hojas jóvenes, raíces, flores y frutos (Zimmermann y Ziegler, 1975). Azúcares tales como sacarosa y la glucosa no son sólo recursos metabólicos y componentes estructurales de las células, sino también elementos que actúan en la señalización de compuestos que pueden alterar la expresión génica del crecimiento y desarrollo de la planta (Smeekens, 2000). Estudios realizados por Fan *et al.* (2010) mostraron que la infección por CLas induce la acumulación de sacarosa en hojas infectadas, lo que implica que la translocación del fotoasimilado se deteriore. Esta acumulación de azúcares puede causar la deformación y disminución en la talla del fruto o el aborto de semillas parcialmente desarrolladas (Gómez-Cárdenas *et al.* 2000). También, el aumento de azúcares se asocia con el moteado asimétrico, amarillamiento y aclaramiento de las nervaduras de las hojas, debido a que éstos conducen a la represión de genes implicados en la fotosíntesis, y síntesis de clorofila (Smeekens, 2000). Así mismo se ha demostrado que la acumulación de almidón en hojas y corteza, y una disminución en raíces, producto del bloqueo del transporte de fotoasimilados, causa necrosis en el floema lo que contribuye a la obstrucción e inducción de otros cambios anatómicos (Schneider, 1968; Etxeberria *et al.* 2009; Fan *et al.* 2010). Cabe mencionar que *C. Liberibacter* tiene la capacidad de metabolizar los azúcares (sacarosa y glucosa), por tanto, la presencia de la bacteria baja la concentración de dichos azúcares en la savia del floema, lo cual finalmente ocasiona cambios en la distribución de los metabolitos de la planta (Kim *et al.* 2009; Mendoza, 2013; Soto, 2014).

Por otra parte, las plantas enfermas por CLas presentan un metabolismo diferente y son químicamente diferentes de las plantas sanas; a menudo son cloróticas y la atracción que el amarillo ejerce sobre la mayoría de los insectos podría explicar la invasión de aquéllas por plagas y vectores, el color de las hojas determinará si el

insecto permanecerá, o no, durante periodos prolongados sobre determinado follaje (Wu *et al.* 2015).

Los cambios en la nutrición de las plantas, principalmente el contenido de aminoácidos y carbohidratos del floema son afectados por el HLB, lo que mejora el valor nutricional para los insectos que se alimentan de éste (Mann *et al.* 2012). La fecundidad, supervivencia, y el comportamiento son rasgos primarios alterados en insectos vectores debido a esta infección (Fereres y Moreno, 2009; Finke, 2012; Mann *et al.* 2012).

Asimismo, la infección por un patógeno tipo fitoplasma en el insecto hospedero tiene implicaciones sobre la incidencia y dispersión de la enfermedad que causa. Si el insecto vive más tiene la oportunidad de infectar a más plantas y producir mayor cantidad de descendientes (Weintraub y Beanland, 2006). Estudios recientes realizados por Martini *et al.* (2015) demostraron que la adquisición de *C. Liberibacter* por *D. citri* aumentó la movilidad y desplazamiento del psílido y con ello la dispersión de la bacteria. También encontraron que las hembras infectadas fueron más atractivas a los machos.

Poco se sabe acerca del efecto directo de un patógeno tipo bacteria sobre su vector; sin embargo, los estudios de Mann *et al.* (2012) refieren que *D. citri* prefiere alimentarse, al menos inicialmente, de plantas infectadas debido a que éstas liberan volátiles como el salicilato de metilo y D-limoneno que median la preferencia del psílido. Aunque, algunos estudios sugieren también que las poblaciones de *D. citri* portadoras de la bacteria son más susceptibles a insecticidas (Tiwari *et al.* 2011) y hongos entomopatógenos (Orduño-Cruz *et al.* 2015), desventaja que fue correlacionada con un gasto energético por síntesis de esteroides y reducción de nutrientes (costo fisiológico), lo cual finalmente afectó la aptitud biológica del insecto.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Campo Experimental Tecomán del INIFAP, ubicado en el Km. 35 Carretera Colima-Manzanillo, Tecomán, Colima.

### 4.1 Cría de *D. citri*

La cría masiva de *D. citri* se estableció en plantas de naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck Rutaceae) var. Valencia y lima mexicana (*C. aurantifolia* Christ Rutaceae) var. Colimex, con ~1000 adultos provenientes de la cría existente en el Área de Insectos Vectores del Programa de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, recolectados inicialmente en huertos de naranja var. Valencia de la comunidad de Cazonos de Herrera, Veracruz, y mantenidas aisladas en invernadero desde 2009. A los adultos se les permitió estar sobre las plantas con brotes durante una semana. Una vez lograda la oviposición en éstas, los insectos se retiraron utilizando un aspirador bucal y las plantas ya infestadas se mantuvieron en jaulas de alambre de acero (30 x 30 x 30 cm) cubiertas con malla antiafidos a una temperatura de  $27 \pm 3^{\circ}\text{C}$  y 12:12 de fotoperiodo, hasta alcanzar la emergencia de nuevos adultos. Las plantas infestadas se colocaron en jaulas libres de adultos con el fin de tener material biológico nuevo y poblaciones con edades controladas.

### 4.2 Plantas sanas

Para realizar las pruebas también se utilizaron plantas de naranja dulce y lima mexicana de 18 meses de edad, adquiridas en el vivero comercial certificado El Edén, en Tecomán, Colima, plantadas en bolsas de plástico negro (18x30 cm), con suelo tipo migajón como sustrato.

### **4.3 Plantas enfermas**

Para la obtención de plantas de naranja dulce positivas al HLB, se recolectaron varetas de árboles de naranja dulce var. Valencia, con evidentes síntomas de la enfermedad de una huerta comercial ubicada en el municipio de Cabo Corrientes, Jalisco. Las varetas se injertaron individualmente sobre plantas sanas del patrón Volkameriana para obtener plantas enfermas que se mantuvieron en invernadero para la realización de las pruebas.

Las plantas de lima mexicana con HLB se generaron injertando varetas procedentes de árboles enfermos, de la misma especie, inicialmente infectados de forma natural y aislados con una casa malla, en la localidad El Ahijadero, municipio de Tecomán, lugar donde se detectó por primera vez la presencia de HLB en 2010 (SENASICA, 2016). Las varetas se injertaron sobre plantas sanas del patrón Macrofila, mismas que se mantuvieron aisladas en invernadero y al cuidado del Dr. José Joaquín Velázquez Monreal, en el Campo Experimental Tecomán-INIFAP. Al momento de emplearse en la presente investigación las plantas infectadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*, tanto de naranja como lima, tenían dos años de edad. La presencia de la bacteria en las plantas enfermas se confirmó mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) Tiempo Real.

### **4.4 Ensayos biológicos**

El estudio se realizó en dos etapas. En la primera, se determinó la supervivencia de *D. citri* en plantas sanas e infectadas con HLB, mientras que en la segunda se evaluó la tasa reproductiva de psílidos sobrevivientes de la primera etapa, en plantas sanas de lima y naranja.

#### **4.4.1 Supervivencia**

La supervivencia de *D. citri*, se determinó a través de la técnica denominada tablas de vida de cohorte (Badii et al. 2000). Para ello se utilizaron cuatro plantas sanas y

cuatro enfermas, tanto de naranja dulce var. Valencia como de lima mexicana var. Colimex de dos años de edad. En cada planta se seleccionaron dos brotes jóvenes que se aislaron, individualmente, empleando una pequeña jaula construida con un recipiente cilíndrico de plástico liso transparente (150 mL de capacidad) con un orificio lateral (2x2 cm) cubierto con tela de organza para permitir la ventilación. Con ayuda de un pequeño microaspirador bucal, y por otro orificio lateral menor se introdujeron 20 psíldos adultos de la cría, en una proporción de machos y hembras de 1:1, de 3 a 6 días de emergidos y con 2 horas en ayuno previo. Después de un periodo de alimentación-adquisición de 48 horas (tanto en plantas sanas como enfermas), los adultos se retiraron y se contabilizó el número de huevos depositados; esto último se hizo bajo un microscopio estereoscópico. Del total de huevos depositados se seleccionaron 100 de ellos (cohorte) por cada brote y el resto se removió con un alfiler entomológico. Cada brote infestado se aisló nuevamente, de la manera como fue indicado, para evitar infestaciones secundarias. Las plantas se dispusieron al azar en diferentes jaulas cubiertas con malla antiáfidos.

Cada 24 horas los brotes se revisaron, bajo un microscopio estereoscópico, para cuantificar el número de huevos y ninfas vivas y muertas, y el instar en que se encontraban en el momento. El registro culminó cuando en las plantas sanas el 95% de ninfas alcanzó el estado adulto. Además, los adultos emergidos se colectaron diariamente, y se transfirieron a brotes de nuevas plantas sanas de la misma especie (naranja dulce o lima mexicana). Cada planta se aisló con una jaula cilíndrica (30x20 cm) construida con alambre y envuelta con tela tul. Cada 24 horas y hasta su muerte, se registró el número de adultos vivos y muertos y su sexo. El estudio se realizó en las mismas condiciones de temperatura y humedad relativa en que se mantuvo la cría. El diseño experimental fue completamente al azar con ocho repeticiones por hospedero y condición y su respectivo testigo, el cual constó de una planta, de naranja o lima, sana o enferma y libre de *D. citri*.

#### 4.4.2 Reproducción

Las tasas de reproducción de cada cohorte se determinaron por medio de la elaboración de tablas de fertilidad. Para ello se seleccionaron al azar 30 parejas de *D. citri*, de un día de emergidas, de las pruebas anteriores (plantas de naranja o lima sanas y/o enfermas). Cada pareja se transfirió a un brote nuevo y se aisló, de igual forma que en el ensayo de supervivencia, con la finalidad de registrar el número de huevos depositados por hembra. Se realizaron 30 réplicas por hospedero y condición y, para facilitar el conteo, cada pareja se transfirió, diariamente y hasta su muerte, a un brote nuevo y aislado de forma individual. Los ensayos se realizaron en condiciones controladas a  $27\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 70% de HR y 12 h de fotoperiodo.

#### 4.5 Análisis Estadístico

A partir de datos obtenidos de los estudios biológicos realizados se estimó la duración de cada estado biológico, ciclo biológico y longevidad de adultos (días). Las medias se compararon usando Tukey ( $p\leq 0.05$ ) en el programa Statistix 8.1. Así mismo con estos datos se estimó la muerte en cada intervalo de edad ( $d_x$ ), la mortalidad aparente ( $100q_x$ ) y la esperanza de vida de los individuos ( $e_x$ ). Las curvas de supervivencia y mortalidad se determinaron mediante la prueba no paramétrica de Log Rank [Mantel-Cox] ( $p\leq 0.05$ ). Para la construcción de las tablas de vida se tomó en cuenta la edad pivotante ( $x$ ), la edad específica de supervivencia ( $lx$ ) y la edad específica de fecundidad ( $mx$ ). Dichos datos fueron registrados en las pruebas de ciclo de vida y fecundidad y se procesaron empleando el programa SAS descrito por Maia *et al.* (2000) con el fin de estimar los intervalos de confianza de los parámetros biológicos, la tasa neta de reproducción ( $R_0$ ), tiempo de generación ( $T$ ), tasa intrínseca de incremento ( $r_m$ ), tiempo de duplicación ( $d$ ) y tasa infinita de crecimiento ( $\lambda$ ). La comparación entre los parámetros se realizó mediante una prueba de  $t$ .

## 5. RESULTADOS

El tiempo de desarrollo promedio de huevo a adulto de *D. citri* fue de  $16.29 \pm 0.8$  días con un intervalo de 15 a 17 días. No se encontraron diferencias claras en el tiempo de desarrollo de cada estadio de las cohortes criadas en plantas de *C. sinensis* y *C. aurantifolia*, sanas e infectadas. No obstante, la duración total del ciclo fue significativamente reducida en plantas de naranja infectadas con CLAs (15.15 días), comparada con los 16-17 d en el resto de los tratamientos ( $gl=3$ ,  $f= 4.29$ ,  $p= 0.0131$ ). La longevidad de adultos de *D. citri* criados en plantas de lima infectadas fue significativamente reducida respecto a las desarrolladas en los otros tratamientos ( $gl=3$ ,  $f= 8.08$ ,  $p= 0.0000$ ) (Cuadro 1).

Más del 58% de los individuos sobrevivió desde huevo a adulto en los cuatro tratamientos y la mayor mortalidad ( $d_x$ ) se presentó en huevo (14-30 %); esta última superó la mortalidad acumulada del resto de los estados ninfales (13 -18 %) (Cuadro 2) (Figura 1).

La supervivencia difirió entre tratamientos ( $\chi^2=609.434$ ,  $gl=3$ ,  $p \leq 0.000$ ), con un mayor número de supervivientes en plantas de naranja respecto a las criadas en lima (Cuadro 2). Se obtuvieron curvas de supervivencia tipo III, lo cual indica que la mortalidad se concentra en los primeros estados de desarrollo. La etapa más vulnerable se registró justo en la fase de huevo y después la mortalidad se mantuvo más o menos estable y a la baja durante los estadios ninfales y el adulto, de modo que la prueba de Log Rank (Mantel-Cox) detectó diferencias ( $p \leq 0.05$ ), hasta los 45 días entre hospederos, y a partir de los 60 días en condición (sanas o infectadas) con tendencia favorable hacia los insectos criados en plantas de naranja infectadas con HLB (Figura 2).



Cuadro 1. Tiempo de desarrollo y longevidad de *D. citri* ( $x \pm EE$ ) en plantas de naranja y lima mexicana, sanas e infectadas con CLas.

Estado de desarrollo	<i>C. sinensis</i> var. Valencia		<i>C. aurantifolia</i> var. Colimex					
	Sana	Infectada	Sana	Infectada				
Huevo	4.26±0.03 d*	5.15±0.03 b	4.88±0.03 c	6.18±0.03 a				
Ninfa I	1.99±0.03 b	1.70±0.03 c	2.50±0.03 a	1.59±0.03 d				
Ninfa II	2.18±0.04 a	1.34±0.04 c	2.25±0.04 a	1.61±0.04 b				
Ninfa III	1.99±0.03 b	1.74±0.03 c	2.26±0.04 a	1.89±0.04 b				
Ninfa IV	2.31±0.04 b	2.58±0.04 a	2.26±0.04 b	2.60±0.04 a				
Ninfa V	4.50±0.04 a	3.70±0.04 c	3.85±0.05 c	4.27±0.05 b				
<b>Total</b>	16.07±0.65 a	15.15±1.19 b	16.83±1.83 a	17.14±0.81 a				
Longevidad Adulto	34.07±0.47 a		33.62±0.48 a					
Longevidad Adulto * sexo	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
	35.5 ± 0.64 a	32.6 ± 0.75 a	35.0 ± 0.66 a	32.2 ± 0.77 a	34.4 ± 0.71 a	31.0 ± 0.67 b	31.8 ± 0.71 b	29.82 ± 0.64 b

\*Medias con la misma letra en una fila no difieren estadísticamente entre sí ( $p \leq 0.05$ ).

La oviposición de *D. citri* comenzó entre los días 4 y 7 posteriores a su emergencia y difirió entre tratamientos ( $g= 3$ ,  $f= 9.36$   $p= 0.0000$ ). El pico máximo de oviposición se registró entre la tercera y cuarta semana posteriores a su emergencia y el mayor tiempo de oviposición se registró en naranja (Figura 3) (Cuadro 3). El número total de huevos depositados ( $633.55 \pm 11.25$ ) por hembra de *D. citri* criada en plantas de naranja infectadas con CLas fue significativamente mayor ( $g= 3$ ,  $f= 37.5$ ,  $p= 0.0000$ ) respecto de los puestos en plantas sanas ( $613.70 \pm 27.94$ ) y en plantas de lima, tanto sanas como infectadas ( $450.43 \pm 11.41$  y  $445.07 \pm 8.34$ , respectivamente).

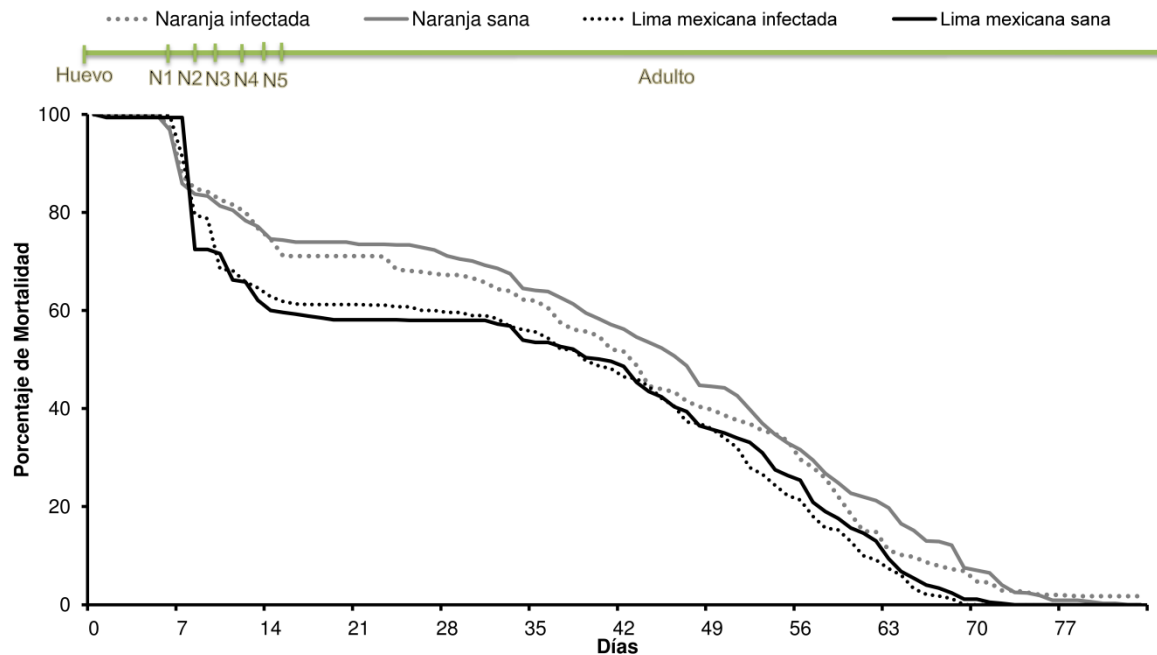


Figura 1. Curvas de mortalidad (Log Rank [Mantel-Cox]) ( $p \leq 0.05$ ) de *D. citri* en plantas de naranja y lima mexicana, sanas e infectadas con CLAs.

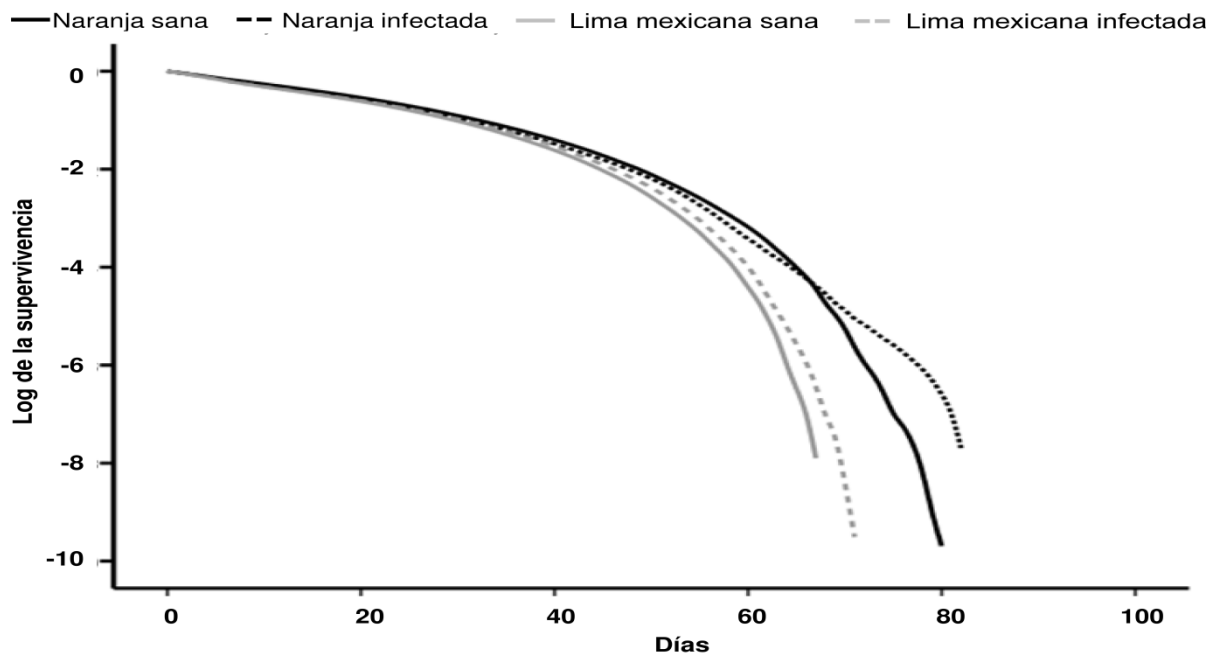


Figura 2. Curvas de supervivencia (Log Rank [Mantel-Cox]) ( $p \leq 0.05$ ) de *D. citri* en plantas de naranja y lima mexicana, sanas e infectadas con CLAs.

Cuadro 2. Tablas de vida (n=800) de cohortes de *Diaphorina citri* en plantas de naranja y lima mexicana, sanas e infectadas con CLas.

Estado de desarrollo	<i>C. sinensis</i> var. Valencia							
	Sana				Infectada			
	$l_x$	$d_x$	$100q_x$	$e_x$	$l_x$	$d_x$	$100q_x$	$e_x$
Huevo	800	112	14	5.34	800	117	15	5.28
Ninfa I	688	9	1	5.13	683	7	1	5.09
Ninfa II	679	9	1	4.19	676	2	0	4.14
Ninfa III	670	44	7	3.24	674	29	4	3.15
Ninfa IV	626	10	2	2.43	645	68	11	2.27
Ninfa V	616	23	4	1.46	577	11	2	1.48
Adulto	593				566			

Estado de desarrollo	<i>C. aurantifolia</i> var. Colimex							
	Sana				Infectada			
	$l_x$	$d_x$	$100q_x$	$e_x$	$l_x$	$d_x$	$100q_x$	$e_x$
Huevo	800	240	30	4.42	800	241	30	4.45
Ninfa I	560	13	2	5.09	559	5	1	5.15
Ninfa II	547	0	0	4.2	554	7	1	4.19
Ninfa III	547	17	3	3.2	547	33	6	3.24
Ninfa IV	530	49	9	2.29	514	19	4	2.42
Ninfa V	481	13	3	1.47	495	4	1	1.49
Adulto	468				491			

Los valores de las tasas netas de reproducción ( $R_0$ ) y el tiempo de generación en los dos hospederos y condición, calculadas a partir de la elaboración de las tablas de fertilidad (Cuadro 3), muestran una disminución en el tiempo generacional y un aumento en la tasa neta de reproducción ( $R_0$ ) (221.73 descendientes/ hembra/ generación), la tasa intrínseca de incremento ( $r_m$ ) (0.13 hijas/hembra/d) y tasa infinita de crecimiento ( $\lambda$ ) (1.14 individuos/d) en los psílicos criados en naranja infectada, en

comparación con los criados en plantas sanas y lima infectada, lo que representa un crecimiento poblacional positivo en psílicos criados en plantas de naranja infectadas (Cuadro 3).

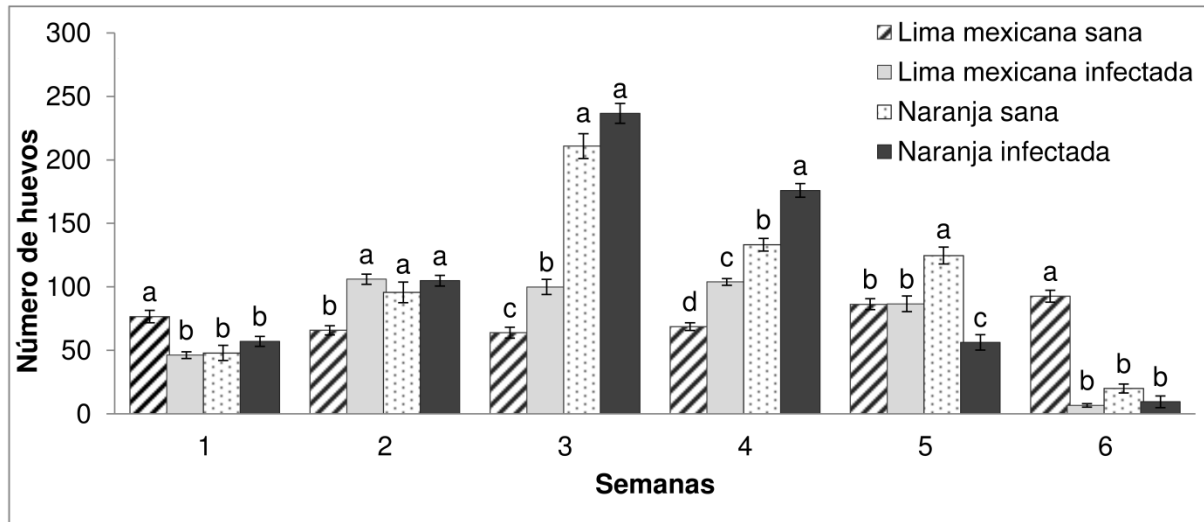


Figura 3. Oviposición semanal de hembras de *D. citri* en plantas de naranja y lima mexicana, sanas e infectadas con CLAs (Statistix 8.1). Normalización de datos con logaritmo y comparación de medias por la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

Cuadro 3. Parámetros de crecimiento poblacional de *Diaphorina citri* en plantas de naranja y lima mexicana, sanas e infectadas con CLas.

Parámetro	<i>C. aurantifolia</i> var. Colimex		<i>C. sinensis</i> var. Valencia	
	sana	infectada	sana	infectada
Tasa neta de Reproducción ( $R_0$ )	135.13 a (120.13-142.13)	133.52 a (128.40-138.64)	214.79 b (194.79-234.80)	221.73 b (213.69-229.79)
Tiempo de Generación (T)	44.31 c (43.72-44.92)	41.59 a (41.06-42.13)	42.45 b (41.86-43.06)	41.03 a (40.61-41.46)
Tasa intrínseca de incremento ( $r_m$ )	0.110 a (0.109-0.112)	0.117 b (0.116-0.119)	0.126 c (0.124-0.129)	0.131 d (0.130-0.133)
Tiempo de duplicación (d)	6.26 d (6.18-6.34)	5.89 c (5.82-5.96)	5.48 b (5.38-5.58)	5.26 a (5.21-5.32)
Tasa infinita de crecimiento ( $\lambda$ )	1.11 a (1.125-1.128)	1.12 b (1.123-1.126)	1.13 c (1.132-1.137)	1.14 d (1.139-1.142)

\*Medias con la misma letra en una fila no difieren estadísticamente entre sí ( $p \leq 0.05$ ).

## 6. DISCUSIÓN

Los efectos de *Candidatus Liberibacter* en su vector parecen variables y complejos con efectos positivos y neutros en su aptitud biológica. *D. citri* como insecto vector, tiene como hospederos a plantas de la familia Rutaceae, particularmente de los géneros *Citrus* y *Murraya*, donde al alimentarse causa distorsión y alteraciones en brotes jóvenes de los árboles (Tsai *et al.* 2002; Halbert y Manjunath, 2004). En gran medida su capacidad de oviposición y supervivencia depende de factores ambientales y de la susceptibilidad del hospedante (Aubert y Hua, 1990; Hodkinson, 2009). En este estudio se comprobó que tanto las plantas de naranja dulce *Citrus sinensis* como de lima mexicana *C. aurantifolia* resultaron favorables para el desarrollo del psílido, pues más del 58% de los individuos alcanzó el estado adulto. Lo anterior coincide con reportes que indican que altas infestaciones pueden ocurrir en cualquier rutácea, siempre y cuando existan condiciones ambientales favorables y haya disponibilidad de brotes (Tsai *et al.* 2002; Hall *et al.* 2008; Ortega-Arenas *et al.* 2013). Los resultados encontrados coinciden con la supervivencia (50%) reportada por otros autores (Baños *et al.* 2012; Alves *et al.* 2014) en estudios similares en *M. paniculata*. Por tanto, se infiere que en iguales condiciones, *D. citri* puede desarrollarse favorablemente en uno u otro hospedero. No obstante, y al igual que lo reportado por varios autores, se encontraron variaciones en el tiempo de desarrollo promedio, de huevo a adulto, en insectos criados en plantas infectadas respecto a las plantas sanas, con tendencias favorables hacia insectos criados en naranja, hecho que se relaciona con el tiempo de exposición previa de los insectos a plantas de naranja, pues como se indicó anteriormente éstos se recolectaron inicialmente en huertos de naranja dulce var. Valencia y se han mantenido en cría en dicho hospedero, lo que probablemente favoreció su acondicionamiento para la realización de los ensayos.

Aunque no se obtuvieron respuestas contrastantes en la supervivencia de individuos de *D. citri* portadores y no portadores de CLAs, se presentaron evidencias que indican una reducción de 1 a 3 días en el tiempo generacional y un aumento en el número de descendientes de los insectos criados en plantas de naranja con HLB, lo cual en el largo plazo representa un crecimiento poblacional favorable en el hospedero. El

crecimiento mejorado de *D. citri* en plantas infectadas por la bacteria parece ser el resultado de la alteración del estado nutricional de la planta y de la supresión de los mecanismos de defensa de la misma contra el vector. Hodkinson (2009) menciona que la baja calidad de nutrientes, especialmente nitrógeno y aminoácidos puede aletargar el desarrollo de las ninfas. Contario a ello se ha demostrado que la infección causada por CLas altera el metabolismo de carbohidratos y afecta la eficiencia del fotosistema II de plantas de lima mexicana, lo que podría favorecer el comportamiento reproductivo del psílido (Esquivel *et al.* 2012; Soto, 2014). Fang *et al.* (2013) demostraron, mediante el silenciamiento génico, que la presencia del TYLCV inhibió la síntesis y liberación de terpenoides, compuestos de defensa de las plantas, mejorando la atracción y la aptitud biológica de *Bemisia tabaci*. Sin embargo, Mann *et al.* (2012) señalan que el grado de afectación depende del tiempo de coevolución e interacción entre el patógeno y el vector, puesto que inicialmente las plantas infectadas con CLas fueron más atractivas a *D. citri* en comparación con las no infectadas, debido a que las infectadas liberan volátiles como el salicilato de metilo y D-limoneno que median la preferencia del psílido. Sin embargo, después de la alimentación, los psíidos se dispersan hacia plantas sanas debido a que la misma infección bacteriana altera la calidad nutricional, reduce el contenido de maltosa y la concentración de volátiles liberados por el hospedero. El hecho de que en este estudio no se hayan obtenido resultados contrastantes en la supervivencia y reproducción de *D. citri* portadores y no portadores de CLas quizás se relacione con la forma en que fueron montados los ensayos, pues los adultos no tuvieron oportunidad de elegir libremente los sitios y tiempos para alimentación y oviposición. Posiblemente si se hubiesen extendido los tiempos de alimentación, por varias generaciones en plantas infectadas, la probabilidad de adquirir una mayor concentración de inóculo, habría repercutido en su capacidad de supervivencia, reproducción y susceptibilidad a diferentes presiones de selección, tal como ha sido documentado que los adultos de *D. citri* portadores de CLas en general fueron más susceptibles a hongos entomopatógenos (Orduño *et al.* 2015) e insecticidas (Tiwari *et al.* 2011). Por su parte Stavrinides *et al.* (2010) mencionan que la asociación entre bacterias fitopatógenas e insectos vectores reduce el desempeño del insecto. Este efecto está bien documentado con *Wolbachia* y *Rickettsias*, donde el

potencial biológico de *Leptopilina heterotoma* y *B. tabaci* se ha reducido por la presencia de estos microorganismos (Fleury *et al.* 2000, Kontsedalov *et al.* 2008). Al ser *D. citri* una plaga invasora y de reciente introducción a México (2002) es posible que el aislamiento geográfico desde su lugar de origen derive en adaptaciones, inicialmente con algunos efectos negativos de CLas sobre el psílido, hasta convertirse en una relación estable, minimizando los efectos deletéreos de la bacteria en el insecto vector ya sea por destrucción del patógeno por enzimas proteolíticas presentes en el intestino o facilitando su tránsito en el cuerpo del insecto para ser expulsado (Czosnek *et al.* 2001; Liu *et al.* 2013). Los resultados en este estudio también muestran que la interacción entre la bacteria y el psílido puede variar en relación con el hospedero. En la interacción naranja-CLas-psílido, la presencia de la bacteria tuvo un efecto benéfico para el insecto, debido a que redujo de 1 a 3 días el tiempo generacional y aumentó la fecundidad de las hembras criadas en plantas con HLB, lo cual en términos biológicos significa un mayor número de descendientes en un menor tiempo. En contraste, en lima mexicana la interacción fue neutral debido a que la aptitud biológica del psílido fue similar al registrado en plantas sanas.

En resumen, los resultados muestran que las interacciones entre *D. citri*-CLas, tanto en lima mexicana como en naranja, fueron favorables para el psílido y que la infección con la bacteria no parece afectar la aptitud biológica del vector, ya que aunque la longevidad del adulto se vio disminuida en lima infectada, la tasa intrínseca de crecimiento y tiempo de duplicación neta fue mayor para los insectos criados en plantas con HLB, lo cual de alguna manera compensa la carga sustitucional de la población.

Conocer mejor la interacción entre el patógeno (CLas), el vector (*D. citri*) y la planta huésped (cítricos) puede ayudar a determinar entre otros aspectos la duración de la relación, el efecto en la dispersión del patógeno y, en el largo plazo, saber si esa relación puede explotarse de alguna manera para mejorar el manejo de este complejo en cítricos.



## 7. CONCLUSIONES

La supervivencia y longevidad de adultos fue mayor en plantas de naranja respecto a las criadas en lima mexicana. No obstante, en el tiempo de desarrollo del psílido, de huevo a adulto, se redujo sobre las plantas de naranja infectadas con CLas en comparación con plantas de lima infectadas y plantas sanas de ambos hospederos.

En todos los tratamientos la etapa más vulnerable en el tiempo de desarrollo de *D. citri* se presentó en estado de huevo, no obstante más del 50% de individuos supervivientes alcanzaron el estado adulto.

La fecundidad, tasa neta de reproducción, tasa intrínseca de incremento, tasa infinita de crecimiento y tiempo de generación fueron favorables para los psílicos portadores criados en naranja, en comparación con los criados en plantas sanas de ambos hospederos y limas infectadas.

Se concluye que la bacteria no parece afectar la aptitud biológica de *D. citri*, pues aunque la longevidad del adulto se vio disminuida en lima infectada, la tasa intrínseca de crecimiento y tiempo de duplicación neto fue mayor para los insectos criados en plantas con HLB, lo cual de alguna manera compensa la carga sustitucional de la población. Por tanto los resultados sugieren un efecto benéfico de la bacteria para psílicos portadores criados en naranja y una interacción neutral entre la bacteria y los psílicos criados en lima mexicana.

## 8. LITERATURA CITADA

- Abrol, D. P. and Shankar, U. (Eds.). 2012. Integrated pest management: principles and practice. CABI. pp. 351-364.
- Almeida, R. P. P., M. J. Blua., J. R. S. López, and A. Purcell. 2005. Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98:775-786.
- Alves, G. R., J. F. Diniz, A. and R. P. Parra J. 2014. Biology of the Huanglongbing vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on different host plants. *J. Econ. Entomol.* 107(2):691-696.
- Arismendi, N. L. and Carrillo, R. 2015. Survival, fecundity, and body mass of *Amplicephalus curtulus* influenced by '*Candidatus Phytoplasma ulmi*'(16SrV-A) infection. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 155(3), 176-183.
- Ammar, E. D., Hall, D. G., Shatters, Jr. R. G. 2013. Stylet morphometrics and citrus leaf vein structure in relation to feeding behavior of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*, vector of citrus Huanglongbing bacterium. *PLoS ONE.* 8(3):e59914.
- Aubert, B. and X. Hua. 1990. Monitoring flight activity of *Diaphorina citri* on citrus and *Murraya* canopies. Pp. 181-187. *In*: B. Aubert, S. Tontyaporn, and D. Buangsuwon (eds). 4th International Asia Pacific Conference on Citrus Rehabilitation. Chiang Mai, Thailand.
- Aubert, B. 1987. *Trioza erytrae* del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. *Fruits.* 42:149-162.
- Atwal, A. S., J. P. Haudhary and M. R. Amzan. 1968. Studies on the development and field population of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama (Psyllidae: Homoptera). *J. Res. Punjab Agric. Univ.* 7:333-338.
- Aurambout, J. P., Finlay, K. J., Luck, J. and Beattie, G. A. 2009. A concept model to estimate the potencial distribution of the Asiatic citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama) in Australia under climate change- A means for assessing biosecurity risk. *Ecol. Modell.* 220:2512-2524.

- Badii, M. H., Flores, A. E. y L. A. Rodríguez del Bosque. 2000. Tablas de vida. pp: 155-166. *In*: M.H. Badii, A. E. Flores y L.J. Galán (eds). Fundamentos y Perspectivas del Control Biológico. UANL, Monterrey.
- Baloch, G. M., and A. Ghaffar. 1984. Natural enemies of *Chenopodium* spp. In Pakistan with notes on *Trioza chenopodii*, a promising biocontrol agent. *Entomophaga*. 29:409-414.
- Baños, H. L., J. Alemán., M. Martínez., D. L. Miranda., H. Rodríguez., M. Suris, y J. Ravelo. 2012. Ciclo y tablas de vida horizontal de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) sobre *Murraya paniculata* L. *Rev. Prot. Veg.*, 27(2): 95-101.
- Beanland, L.; Hoy, C.W., Miller, S.A. and Nault, L. R. 2000. Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 93:271-276.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Radek, A. J., Shevchenko, D. V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. W. and Hogenhout, S. A. 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*. 188, 3682-3696.
- Bassanezi, R. B. 2010. Epidemiology of Huanglongbing and its implications on disease management. 2º Taller internacional sobre el Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos. Mérida, Yucatán, México. s/n
- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol*. 88:7-37.
- Buitendag, C.H., von Broembsen, L. A. 1993. Living with citrus greening in South Africa. *Citrus Journal*. 3:29-32.
- Capoor, S. P., D. G. Rao, and S. M. Visvanath. 1974. Greening disease of citrus in the Deccan Trap country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. p. 43-49. *In*: Proc. 6th Conf. IOVC, Univ. Calif., Div. Agri. Sci., Richmond.
- Chavan, V. M. and A. S. Summanwar. 1993. Population dynamics and aspects of the biology of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuw., in Maharashtra. pp. 286-290. *In*: P. Moreno, J. V. da Graca, and L. W. Timmer (eds.). 12 th Coference of the International Organization of Citrus Virologists. University of California, Riverside.

- Chen, C. N. 1998. Ecology of the insect vectors of citrus systemic diseases and their control in Taiwan. *Managing banana and citrus diseases*. p. 62.
- Childers, C. C., Simms, M. K. and Threlkeld, D. K. 2002. Evaluation of insecticides for control of Asian citrus psylla (ACP) on Florida citrus, 2001. *Arthropod Manag. Tests*. 27:D2.
- Czosnek, H., M. Ghanim., S. Morin., G. Rubinstein., V. Fridman, and M. Zeidan. 2001. Whiteflies: vectors—or victims? – of geminiviruses. *In: "Advances in Virus research"*, Maramorosch K. (ed). Academic Press. 57:291-322.
- Duan, Y. P., Zhou, L. J., Hall, D. G., Li, W. B. and Doddapaneni, H. 2009. Complete genome sequence of citrus Huanglongbing bacterium, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' obtained through metagenomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 22:1011–20.
- Etxeberria, E., González, P., Achor, D., and Albrigo, G. 2009. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 74:76-83.
- Esquivel, C. F., Valdovinos-Ponce, G., Mora Aguilera, G., Gómez-Jaimes, R.; Velásquez Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M.A., Flores Sánchez, J. L. y López-Arroyo, J. I. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Agrociencia*. 46:769-782
- Fang, Y., X. Jiao., W. Xie., S. Wang., Q. Wu, and X. Shi. 2013. Tomato yellow leaf curl virus alters the host preferences of its vector *Bemisia tabaci*. *Sci. Rep.* 3, 2876 doi: 10.1038/srep02876. Pmid:24096821.
- Fan, J., Chen, C., Brlansky, R. H., Gmitter Jr, F. G., and Li, Z. G. 2010. Changes in carbohydrate metabolism in *Citrus sinensis* infected with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Plant Pathology*. 59(6), 1037-1043.
- Fereres, A. y Moreno, A. 2009. Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus research*. 141(2), 158-168.
- Fernández, M., y I. Miranda. 2005. Comportamiento de *Dhiaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en tres hospederos en el estado Lara, Venezuela. *Entomopotrónica*. 22(3):145-152.

- Finke, D. L. 2012. Contrasting the consumptive and non-consumptive cascading effects of natural enemies on vector-borne pathogens. *Entomol Exp Appl* 144:44–55.
- Fleury, F., F. Vavre., N. Ris., P. Fouillet, and M. Bouletreau. 2000. Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. *Parasitology*. 12:493–500.
- Fonseca, O., N. Valera, y C. Vásquez. 2007. Registro y ciclo de vida de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en tres hospederos en el estado Lara, Venezuela *Entomotropica*. 22(3):145-152).
- Fung, Y. C., and C. N. Chen. 2006. Effects of temperature and host plant on population parameters of the citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama). *Formosan Entomol.* 26:109-123.
- Grafton-Cardwell, E. E., L. L. Stelinski, and P. A. Stansly. 2013. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. *Ann. Rev. Entomol.* 58: 413-432.
- Gómez-Cadenas A, Mehouchi J, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talon M. 2000. Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus. *Planta*. 210, 636–643.
- Halbert, S. E. and K. L. Manjunath. 2004 Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Fla. Entomol.* 87(3): 401-402.
- Hall, D. G., M. G. Hentz, and R. C. Adair. 2008. Population ecology and phenology of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in two Florida citrus groves. *Environ. Entomol.* 37(4): 914-924.
- Hodkinson, I. D. 2009. Life cycle variation and adaptation in jumping plant lice (Insecta: Hemiptera: Psylloidea): a global synthesis. *Journal of Natural History* . 43:65-179.
- Hollis, D. 1987. A new citrus-feeding psyllid from the Comoro Islands, with a review of the *Diaphorina amoena* species group (Homoptera). *Systematic Entomology*. 12:47-61.
- Huang B. 1990. Citrus Psyllid. *Chinese Agricultural Encyclopedia (Volumen Insects)*. Beijing: Agriculture Press. pp 119-120 (in Chinese).

- Huang, J., X. Luo, B. Huang, and X. Yao. 1999. Studies on citrus psylla *Diaphorina citri* Kuwayama and its control. Entomological Journal of East China 8:26-34 (in Chinese with English abstract).
- Hung, T. H., Hung, S. C., Chen, C., Hsu, M. H. and Su, H. J. 2004. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. Plant Pathology. 53:96–102.
- Hunt, R. E. and L. R. Nault. 1990. Influence of life history of grasses and maize chlorotic dwarf virus on the biotic potential of the leafhopper *Graminella nigrifrons* (Homoptera: Cicadellidae). Environ. Entomol. 19:76–84.
- Inoue, H., J. Ohnishi., T. Ito., K. Tomimura., S. Miyata., T. Iwanami, and W. Ashihara. 2009. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. Ann. Appl. Biol. 155:29-36.
- Kingdom, H. N. and A. S. Hogenhout. 2007. Aster yellows phytoplasma witches' broom AY-WB; '*Candidatus Phytoplasma asteris*' increases survival rates of *Macrosteleus quadrilineatus* and *Dalbulus maidis* on various plant species. Bull. Insect. 60:225-226.
- Kim, J. S., Sagaram, U. S., Burns, J. K., Li, J. L., and Wang, N. 2009. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection: Microscopy and microarray analyses. Phytopathology. 99:50-57.
- Kontsedalov, S., E. Zchori-Fein., E. Chiel, Y. Gottlieb, M. Inbar, and M. Ghanim. 2008. The presence of *Rickettsia* is associated with increased susceptibility of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides. Pest Manag. Sci. 64(8):789-792.
- Liu, B. M., E. L. Preisser, D. Chu, H. Pan, W. Xie, S. Wang, Q. Wu, X. Zhou and Y. Zhang. 2013. Multiple forms of vector manipulation by a plant-infecting virus: *Bemisia tabaci* and tomato yellow leaf curl virus. J. Virol. 87, 4929–4937.
- Liu, Y. H. and J. H. Tsai. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. Journal of Economic Entomology. 93:1722-1725.
- Llenderal, C. 2000. Introducción a la fisiología de insectos. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. pp 21-31.

- Lopes, S. A., Frare, G. F., Bertolini, E., Cambra, M., Fernandes, N. G., Ayres, A. J., and Bové, J. M. 2009. Liberibacter associated with citrus huanglongbing in Brazil: 'Candidatus Liberibacter asiaticus' is heat tolerant, 'Ca. L. americanus' is heat sensitive. *Plant Disease*. 93(3), 257-262.
- Luan, J. B., D. M. Yao, T. Zhang, L. L. Walling, M. Yang, and Y. Wang. 2013. Suppression of terpenoid synthesis in plants by a virus promotes its mutualism with vectors. *Ecol. Lett.* 16:390–398.
- Luan, J. B., X. W. Wang, J. Colvin, and S. S. Liu. 2014. Plant-mediated whitefly-begomovirus interactions: research progress and future prospects. *Bull. Entomol. Res.* 104:267–276.
- Luo, X., A. L. Yen, S. Powell, F. Wu, Y. Wang, L. Zeng, Y. Yang, and Y. Cen. 2015. Feeding behavior of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and its acquisition of 'Candidatus Liberibacter asiaticus', on huanglongbing-infected *Citrus reticulata* leaves of several maturity stages. *Fla. Entomol.* 98:186–192.
- Maia, A. H., A. J. Luiz, and C. Campanhola. 2000. Statistical inference on associate fertility life table parameters using Jackknife technique: computational aspects. *J. Econ. Entomol.* 93:511-518.
- Malagnini, V., F. Pedrazzoli., V. Gualandri., F. Forno., R. Zasso., A. Pozzebon, and C. Loriatti. 2010. A study of the effects of 'Candidatus Phytoplasma mali on the psyllid *Cacopsylla melanoneura* (Hemiptera: Psyllidae). *J. Invert. Pathol.* 103: 65-67.
- Mann, R. S., J. G. Ali., S. L. Hermann., S. Tiwari., K. S. Pelz-Stelinski., T. Alborn, and L. L. Stelinski. 2012. Induced Release of a Plant-Defense Volatile 'Deceptively' Attracts Insect Vectors to Plants Infected with a Bacterial Pathogen. *PLoS Pathog.* 8(3): e1002610.
- Mann, R. S., Pelz-Stelinski, K., Hermann, S. L., Tiwari, S., and Stelinski, L. L. 2011. Sexual transmission of a plant pathogenic bacterium, Candidatus Liberibacter asiaticus, between conspecific insect vectors during mating. *PLoS One*, 6(12), e29197.
- Maramorosch, K. and H. Koprowski (Editors), *Methods in Virology*. 1984 Academic Press, New York. 4563 pp.
- Matthews, R. E. F. 1981. *Plant Virology*, Academic Press, London. 215 p.

- Mead, F. W. 1977. The Asiatic citrus psylla *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). Entomology Circular. 180:1-4.
- Medina, U. M., G. E. Zapiaín., M. M. G. Robles., O. Z. Pérez., M. S. Orozco., T. Williams, and S. R. Becerra. 2007. Fenología, eficiencia productiva y calidad de fruta de cultivares de naranjo en el tropic seco de Mexico. Revista Fitotecnia Mexicana. 30 (2):133-143.
- Mendoza, P. 2013. Compuestos Volátiles de brotes de limón persa y limón mexicano asociados a síntomas de HLB (Huanglongbing). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Montecillo, México. Tesis de Maestría. pp. 4-9.
- Michaud, J. P. 2004. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in Central Florida. Biol. Cont. 29(2): 260-269.
- Moran, V. C., and Brown, R. P. 1973. The antennae, host plant chemoreception and probing activity of the citrus psylla *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Homoptera: Psyllidae). Entomological Society of Southern Africa. 36:191-202.
- Moran, V. C., and P. R. Buchan. 1975. Oviposition by the citrus psylla. *Trioza erytreae* (Homoptera: Psyllidae), in relation to leaf hardness. Entomologia Experimentalis et Applicata. 18: 96-104.
- Murrall, D. J., Nault, L. R., Hoy C. W., Madden, L. V., Miller, S. A. 1996. Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of Aster Yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). Journal of Economic Entomology. 89: 1223-1232.
- Nava, D. E., Torres, M. L. G., Rodrigues, M. D. L., Bento, J. M. S. and Parra, J. R. P. 2007. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. Journal of Applied Entomology. 131(9-10), 709-715.
- Orduño-Cruz N., A. W. Guzmán-Franco and E. Rodríguez-Leyva. 2015. *Diaphorina citri* populations carrying the bacterial plant pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* are more susceptible to infection by entomopathogenic fungi than bacteria-free populations. Agric. Forest Entomol.1-4.
- Ortega-Arenas, L. D., A. Villegas-Monter., A. J. Ramírez-Reyes., E. E. Mendoza-García. 2013. Abundancia estacional de *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) en



- plantaciones de cítricos en Cazonas, Veracruz, México. Act. Zool. Mex. (n.s.). 29:317-333.
- Orozco-Santos, M., Robles-González M. M., Velázquez-Monreal J. J., Manzanilla-Ramírez M. A., Bermúdez-Guzmán M. J., Carrillo-Medrano S. H., Medina-Urrutia V. M., Hernández-Fuentes L. M., Gómez-Jaime R., Manso-Sánchez G., Farías-Larios J., Nieto-Ángel D., Mijangos-Hernández E., Sánchez- de la Torre J. A., y Varela-Fuentes S (Eds.). 2014. El limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). Libro Técnico Núm. 1. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán, Tecomán, Colima, México. 449p.
- Orozco, S. S. 1995. Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México, Universidad Autónoma Chapingo, México. 150 p
- Pelz-Stelinski, K. S., R. H. Bransky., T. A. Ebert, and M. E. Rogers. 2010. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). J. Econ. Entomol. 103:1531-1541.
- Power, A. 1992. Patterns of virulence and benevolence in insect-borne pathogens of plants. Crit. Rev. Plant Sci. 11: 351-372.
- Purcell, A. H. 1982. Insect vector relationships with prokaryotic plant pathogens. ~~Ann.~~ Ann. Rev. Phytopathol. 20:397-417.
- Qureshi, J. A. and P. A. Stansly. 2008. Rate, placement, and timing of aldicarb applications to control Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in oranges. Pest Management Science. 64:1159-1169.
- Ramos, C. 2008. Huanglongbing (“citrus greening”) y el psílido asiático de los cítricos, una perspectiva de su situación actual, Oficial Agrosanitario del OIRSA, México D.F.
- Robles, G. P. L. 2010. Protocolo de actuación ante la emergencia por las detección del Huanglongbing. Direccion de Proteccion Fitosanitaria. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 27p.
- Robles, G. P. L. 2012. Protocolo para establecer áreas regionales de control del Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos (ARCOs). Direccion de Proteccion Fitosanitaria. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 60p.

- Roistacher, C. N. 1991. Greening, pp. 35-45. In Techniques for biological detection of species citrus graft transmissible diseases. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Roistacher, C. N. 1996. The economics of living with citrus diseases: huanglongbing (greening) in Thailand. pp. 279-285 in: J. V. Da Garcia, P Moreno and R. K. Yokomi (eds.). Proceedings of the 13th Conference of the International Organization Of Citrus Virologists. Univ. of California, Riverside.
- Roossinck, M. J. 2011. The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* 9: 99-108.
- Salcedo, D., I. Raúl., G. Mora., I. Covarruvias., F. Deapolis, y S. Mora. 2012. Evaluación de Impacto Económico de Huanglongbing (HLB) en la Cadena Citrícola Mexicana, Inter American Institute for Cooperation on Agriculture IICA, México, D.F. 141 p.
- Salcedo, D., Raúl, I., Mora, G., Covarruvias, I., Deapolis, F. y Mora, S. 2010. Evaluación de Impacto Económico de Huanglongbing (HLB) en la Cadena Citrícola Mexicana, Inter American Institute for Cooperation on Agriculture IICA, Mexico, D.F.
- Saxena, R. C. and Z. R. Khan. 1985. Electronically recorded disturbances in feeding behavior of *Nephotettix virescens* (Homoptera: Cicadellidae) on neem oil-treated rice plants. *J. Econ. Entomol.* 78: 222-226.
- SENASICA. 2016. Situación actual y perspectivas del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos en México. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/default.asp?id=2906> (fecha de consulta 30 enero 2016).
- SENASICA. 2012. Protocolo para establecer áreas regionales de control del Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos (ARCOs). (En línea) Disponible en: <http://www.siafeson.com/sitios/simdia/docs/protocolos/ProtocoloparaestablecerAreasRegionalesARCOSDICIEMBRE2012.pdf> (Fecha de consulta 8 de abril 2016).
- Shankar, U., and D.P. Abrol. 2012. Role of Integrated Pest Management in Food and Nutritional Security. *Integrated Pest Management: Principles and Practice*, 408 p.
- SIAP. 2012. Producción agrícola por cultivo y por estado. México (En línea). Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com.wrapper&view=wrapper&Itemid=350> (Fecha de consulta 03 de febrero 2016).

- SIAP. 2014. Producción agrícola por cultivo y por estado. México (En línea). Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com.wrapper&view=wrapper&Itemid=350>. Fecha de consulta 04 de Abril 2016.
- Stavrínides, J., A. No, and H. Ochman. 2010. A single genetic locus in the phytopathogen *Pantoea stewartii* enables gut colonization and pathogenicity in an insect host. *Environ. Microbiol.* 12:147-155.
- Stewart M. G. and Banerjee N. 1999. Mechanisms of Arthropod Transmission of Plant and Animal Viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, March 1999. p. 128–148.
- Smeekens, S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 49–81.
- Schneider, H. 1968. Anatomy of freening-disease sweet orange shots. *Phytopathology.* 58:1155-1160.
- Soto Leal, M. G. 2014. Respuesta fisiológica y bioquímica de plantas de limón mexicano infectadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*. pp 36-52.
- Tiwari, S., K. Pelz-Stelinski, and L. L. Stelinski. 2011. Effect of *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection on susceptibility of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, to selected insecticides. *Pest Manag. Sci.* 67: 94-99.
- Tiwari, S., L. L. Stelinski, and M. E. Rogers 2012. Biochemical basis of Organophosphate and carbamate resistance in Asian Citrus Psyllid. *J. Econ. Entomol.* 105(2):540-548.
- Tsai, J. H. and Y. H. Lui. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. *Journal of Economic Entomology* 96 (6):1721-1725.
- Tsai, J. H., J. J. Wang, and Y. H. Lui. 2002. Seasonal abundance of Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Southern Florida. *Florida Entomologist.* 85 (3):446-441.
- Tsagkarakis, A. E., and Rogers, M. E. 2008. Effects of host plant on fitness of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. Pp. 258. *In*: Tim R. Gottwald James H. Graham (eds.). International Research Conference of Huanglongbing. Orlando Florida.
- Trivedi, P., Sagaram, U. S., Kim, J. S., Brlansky, R. H., Rogers, M. E., Stelinski, L. L., Oswalt, C. and Wang, N. 2009. Quantification of viable *Candidatus Liberibacter*

- asiaticus in hosts using quantitative PCR with the aid of ethidium monoazide (EMA) Eur. J. Plant Pathol. 124:553–563.
- Wang, Z. 2002. Distribution and spread of citrus huanglongbing in citrus-planting region in Guizhou Province. Cultivation and Plating 4:62-63 (in Chinese).
- Weintraub, P. G. and L. Beanland. 2006. Insects vectors of phytoplasmas. Annual Review of Entomology. 51:91-111.
- Weintraub, P. G. and L. Beanland. 2006. Insects vectors of phytoplasmas. Ann. Rev. Entomol. 51:91-111.
- Weninger, E. J., L. L. Stelinski, and D. G. Hall. 2009. Relationships between adult abdominal color and reproductive potential in *Diaphorina citri* (hemiptera: Psyllidae). Annals of the Entomological Society of America. 102(3):476-483.
- Wu, F., Zheng, Z., Deng, X., Cen, Y., Liang, G., and Chen, J. 2015. Draft genome sequence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” from *Diaphorina citri* in Guangdong, China. Genome announcements. 3(6), e01316-15.
- Xu, C. F., Xia Y. H., Li K. B. and Ke, C. 1988. Further study of the transmission of citrus Huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: Proceedings of 10th Conference of International Organization of Citrus Virologists, pp. 243–248. Eds L.W. Timmer, S.M. Garnsey and L. Navarro. Riverside, CA, USA: University of California, Riverside.
- Yamamoto, P. T., Felipe, M. R., Garbim, L. F., Coelho, J. H. C., Ximenes, N. L., Martins, E. C., Leite, A. P. R., Sousa, M. C., Abrahão, D. P. and Braz, J. D. 2006. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): Vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. Proceedings of the Huanglongbing Greening International Workshop, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. pp 96–97
- Zimmermann, M. H., and Ziegler, H. 1975. List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In: Zimmermann MH, Milburn JA., eds. Transport in plants. Phloem transport. Encyclopaedia of Plant Physiology. Berlin: Springer-Verlag. 480–503.