

USO DE *Metarhizium anisopliae* Y *Cordyceps bassiana* (ASCOMYCETES) PARA EL CONTROL DE *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: PSYLLIDAE) EN LIMÓN MEXICANO

Roberto Lezama-Gutiérrez¹, Alberto Ramírez-Mancilla¹, Heraclio Castrejón-Agapito¹, Juan José Peralta-Manzo¹, Oscar Rebolledo-Domínguez¹. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima. KM 40 Carretera Colima-Manzanillo, C.P. 28930, Tecomán, Colima, México. rlezama@ucol.mx. ²Programa Educativo de Medicina Veterinaria y Zootecnia, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato, Ex-Hacienda El Copal, Km. 7 Carretera Irapuato-Silao, Irapuato, Guanajuato. sahaun01@yahoo.com.mx.

RESUMEN: Se evaluó a *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin y *Cordyceps bassiana* (Bals.) Vuill., para el control de *Diaphorina citri* Kuwayama, en un huerto de limón Mexicano. En 4 parcelas de 3.5 ha se aplicaron quincenalmente los tratamientos. 1 y 2, formados por *M. anisopliae* y *C. bassiana* con dosis de 2×10^{13} conidios/ha, respectivamente; el tratamiento 3, la aplicación alternada de insecticidas y tratamiento 4 aceite mineral. Aplicados con turbo aspersor con tirón, con tanque de capacidad de 2000 L de agua. Cada semana se registró el número de ninfas y adultos/brote, de 10 árboles seleccionados en el centro de cada parcela. En ninfas *C. bassiana* y *M. anisopliae* compartieron igualdad estadística con el tratamiento químico, excepto en la segunda, tercera y novena aplicación. En adultos Ma 198 compartió igualdad con el tratamiento químicos en la aplicación tres, cuatro, siete y diez; *C. bassiana* fue igual al insecticida, con 2, 4 y 7 aplicaciones.

Palabras clave: *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana*, *Diaphorina citri*, Control biológico

Use of *Metarhizium anisopliae* and *Cordyceps bassiana* (Ascomycetes) to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) control in Mexican Lemon

ABSTRACT: *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Cordyceps bassiana* (Bals.) Vuill. were evaluated for control of *Diaphorina citri* Kuwayama, on Mexican lemon orchard. In 4 plots of 3.5 ha were applied weekly treatments. 1 and 2, consisting of *M. anisopliae* and *C. bassiana* conidia dose of 2×10^{13} / ha, respectively; treatment 3, the alternate application of insecticides and Treatment 4 mineral oil; applied with turbo sprayer. Each week the number of nymphs and adults / outbreak of 10 selected trees, in the center of each plot were recorded. In nymphs *C. bassiana* and *M. anisopliae* shared statistical equality with chemical treatment, except in the second, third and ninth application. In adults Ma 198 shared equally with chemical treatment in the application three, four, seven and ten; *C. bassiana* was equal to the insecticide, with 2, 4 and 7 fungal applications.

Key words: *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana*, *Diaphorina citri*, Biological control

Introducción

La citricultura mundial está amenazada por la llegada, dispersión y establecimiento del psílido Asiático *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en diferentes países (Aleman *et al.*, 2007); las ninfas y adultos al alimentarse deforman de hojas y brotes jóvenes, a causa de las toxinas contenidas en su saliva; sus secreciones cerosas provocan el desarrollo de fumagina en las hojas (Halbert y Manjunath, 2004); además, es vector de la bacteria “*Candidatus Liberibacter spp.*”, causante de la enfermedad llamada “Huanglongbing” o HLB, que ocasiona reducción en la producción y la muerte de los árboles (Meyer *et al.*, 2007). En México se cuenta con una 549 mil ha de cítricos, en 23 estados del país y en 11 de ellos se ha detectado la enfermedad de HLB [Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), 2012].

El Control del HLB está basado en 4 principios fundamentales: 1) prospección exhaustiva de la bacteria y vector, 2) eliminación la planta enferma, 3) control químico del insecto vector y

4) reemplazo de la planta infectada por una planta nueva procedente de viveros certificados. El control biológico es una estrategia importante para el manejo integrado de insectos plaga (Roy *et al.*, 2006). *D. citri* es susceptible a los hongos *Isaria fumosorosea* (Wize), *Hirsutella citriformis* Speare, *Lecanicillium lecanii* Zimm. (= *Verticillium lecanii*), *Cordyceps bassiana* (Bals.) Vuill. (= *Beauveria bassiana*) (Étienne *et al.*, 2001) y a *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Lezama *et al.*, 2012). En México se cuenta con diversas cepas de hongos, aisladas de ninfas y adultos de *D. citri*, de las especies *M. anisopliae*, *C. bassiana*, *I. fumosorosea* e *H. citriformis*; estas cepas causan una mortalidad comprendida entre 69 y 99% en adultos y 52 a 84 % en ninfas (Díaz, 2011). La cepa de *M. anisopliae* Ma 198 presenta una CL_{50} de 1.3×10^2 conidios/mL en adultos y 1.6×10^5 conidios/mL en ninfas; la cepa de *C. bassiana* Cb 249 presenta una CL_{50} de 1.0×10^5 conidios/mL en adultos y de 2.7×10^4 conidios/mL en ninfas (Galván, 2012); estas cepas no han sido evaluadas en campo. Por lo anterior, se presentan los resultados de la evaluación de la efectividad de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* cepa Ma 198 y *C. bassiana* cepas Cb 249, en el control biológico de *D. citri* en limón Mexicano, bajo condiciones de campo.

Materiales y Método

Este trabajo forma parte del proyecto “Desarrollo y evaluación de tecnologías para el manejo sustentable de Huanglongbing (“Ca. L. asiaticus”) y su vector (*D. citri*) en los cítricos ácidos del Pacífico de México”, financiado por CONACYT-FORDECYT clave: 139259. Se desarrolló en dos etapas; una en el Laboratorio y otra en campo, en una parcela comercial de limón Mexicano, de cinco años de edad, en el Rancho “el Pollito”, propiedad del Sr. James Marvin Readhimer Muse, ubicado en Armería, Colima, México, con una precipitación media anual de 780.2 mm y 26.3 °C de temperatura, clima cálido-subhúmedo, HR promedio de 81.65 %, suelo con textura franco-arcillosa y pH 6.8 (INIFAP, 2012). Las cepas *M. anisopliae* Ma 198 y *C. bassiana* Cb 249, de la Colección de Hongos Entomopatógenos de la Universidad de Colima, se multiplicaron en agar dextrosa Sabouraud, extracto de levadura, con 500 ppm del antibiótico cloranfenicol; se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con 70% HR y 12 horas luz/oscuridad durante 21 días (Sun y Liu, 2006). Los conidios se utilizaron para la multiplicación masiva, en grano entero de arroz (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2012).

El experimento se realizó del 01 de noviembre del 2012 al 21 de marzo del 2013. Se evaluaron cuatro tratamientos, aplicados quincenalmente en 3.5 ha cada uno; el primero y el segundo, lo formaron la aplicación de una suspensión de esporas a dosis de 2×10^{13} conidios/ha de *M. anisopliae* y *C. bassiana*, respectivamente, aplicaron con un turbo-aspersor con tirón de tractor. El tercer tratamiento fue la aplicación alternada de los insecticidas, Engeo (Thiametoxam y Lambda Cyalotrina) (50 mL/100 L de agua) (Bayer CropScience); Cypermetrina CE 50% al 0.1%; aceite mineral a la concentración de 0.5% (PureSpray Foliar 22 E (10 L/2000 L de agua); ANASEFT (5%) Malathion 1000 (1%); Muralla® Max 300 OD (mezcla de Imidacloprid y Betacyfluthrin) (50 mL/100 L de agua) (Bayer CropScience); Clorpirifosetil CE 50% al 0.1% y Thiodan® 35 CE (Endosulfán) al 0.15%. El cuarto tratamiento (testigo) fue aceite mineral al 0.5 % (10 L/2000 L de agua).

Se realizaron 11 aplicaciones; la primera se realizó el 7 de Noviembre del 2012 y la última el 15 de marzo del 2013. Siete días antes y 7 después de aplicar los tratamientos, se contabilizaron el número de ninfas y adultos totales por brote (Miranda *et al.*, 2008), con un total de 12 muestreos (Stauderman *et al.*, 2012). En cada tratamiento se seleccionaron 10 árboles, en la línea del centro de cada unidad experimental y de cada árbol se seleccionaron cuatro brotes de

menos de 5 cm de longitud infestados con ninfas y adultos, un brote en cada uno de los cuatro puntos cardinales, a una altura de 1.5 m. También se instaló un dispositivo para registrar la temperatura y humedad relativa (Datalogger, marca Hobo), con la finalidad de saber los rangos de temperaturas y humedad relativa, a los que estuvieron expuestos los tratamientos. Se realizaron análisis de varianza y prueba de medias por Tukey al 0.05, antes y después de la aplicación, previa transformación de los datos mediante $\sqrt{X+1}$, con el paquete estadístico SAS, versión 1997 (SAS, 1997) (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2012).

Resultados y Discusión

Efecto de *M. anisopliae* y *C. bassiana* sobre la densidad de ninfas y adultos de *D. citri*. En ninfas los análisis de varianza indicaron diferencias altamente significativas entre tratamientos, en cada una de las aplicaciones ($P < 0.0029$), excepto en la cuarta aplicación ($P = 0.3491$). Los tratamientos formados por los hongos *C. bassiana* y *M. anisopliae* compartieron igualdad estadística con el tratamiento químico, excepto en la segunda, tercera y novena aplicación. Con el aceite, el hongo *C. bassiana* presentó igualdad estadística en las aplicaciones 2, 3, 4, 5, 9 y 10; mientras que el hongo *M. anisopliae* presentó igualdad estadística con el aceite con 2, 4, 5 y 10 aplicaciones (Cuadro 1). Durante el periodo experimental se registraron valores de temperatura ambiente comprendidos entre los 16 y 34.6 °C, con una media de 25.85°C y una humedad relativa comprendida de 67.4 a 91.6 %, con una media de 83.37%. En adultos, los análisis de varianza, indicaron diferencias altamente significativas entre tratamientos ($P < 0.0029$), excepto en la cuarta aplicación ($P = 0.0509$). El hongo Ma 198 compartió igualdad estadística con el tratamiento formado por insecticidas químicos con tres, cuatro, siete y diez aplicaciones de los tratamientos; el tratamiento *C. bassiana* también presentó igualdad estadística con el insecticida, con 2, 4 y 7 aplicaciones; y el aceite presentó igualdad estadística con los tratamientos por hongos en 7 de las 11 aplicaciones de los tratamientos (Cuadro 2).

Los resultados obtenidos indicaron, que prácticamente no existen diferencias entre ambas especies de hongos, para reducir poblaciones de ninfas y adultos de *D. citri*, resultados similares fueron reportados por Lezama-Gutiérrez *et al.* (2012) al evaluar diversas cepas de *M. anisopliae*, *C. bassiana* e *I. fumosorosea* en limón Persa, en donde no encontró diferencias entre cepas o especies de hongo. Del mismo modo, el tratamiento químico también presentó poca diferencia con los hongos, por lo que es posible el uso alternado de *C. bassiana* o *M. anisopliae*, o insecticidas químicos, para el control de ninfas o adultos de *D. citri*. El tratamiento formado por la aplicación continua de aceite mineral permite la presencia de mayor densidad de ninfas y adultos, por lo que sería recomendable utilizarlo en mezcla, ya sea con hongos o con insecticidas químicos, sin olvidar que los insecticidas dan protección del cultivo por un periodo muy corto e impactan sobre la entomofauna benéfica (Qureshi *et al.*, 2009).

Cuadro 1. Medias del número de adultos de *D. citri* por brote, bajo el efecto de diferentes números de aplicaciones y tratamientos en condiciones de campo.

Tratamiento	Número de Aplicaciones											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	01/11*	15/11	22/11	6/12	20/12	3/01	21/01	31/01	14/02	28/02	14/03	21/03
Ma198	1.55 ab	1.75 a	1.74 a	1.56 ab	1.48 ab	1.56 a	1.62 a	1.45 b	1.48 b	1.51 a	1.48b	1.58 a
Bb249	1.71 a	1.57 a	1.51 b	1.76 a	1.51 ab	1.57 a	1.62 a	1.53 b	1.52 b	1.54 a	1.84 a	1.63 a
Aceite	1.43 ab	1.60 a	1.63 ab	1.74 a	1.59 a	1.53 a	1.68 a	1.76 a	1.73 a	1.69 a	1.96 a	1.01 b
Químico	1.19 b	1.24 b	1.53 b	1.43 b	1.44 b	1.38 b	1.45 b	1.40 b	1.01 c	1.13 b	1.20 b	1.02 b
SC trat.	1.408	1.399	0.335	0.728	0.122	0.248	0.308	0.738	2.773	1.734	3.604	3.532
SC error	3.547	1.183	0.718	1.070	0.516	0.376	0.470	0.986	0.510	1.138	2.763	0.816
F. calculada	4.51	14.20	5.60	8.16	2.85	7.93	7.88	8.98	65.15	18.28	15.65	51.92
Pr>F	0.0087	0.000	0.0029	0.0003	<u>0.0509</u>	0.000	0.0004	0.000	0.000	0.000	0.0001	0.0001
		1				3		1	1	1		
CV	21.88	11.74	8.78	10.58	7.92	6.74	7.16	10.76	8.29	12.08	17.05	11.46

GL de trat. = 3; GL del error= 36; Datos transformados con $\sqrt{x+1}$; *Promedios entre columnas con la misma letra entre columnas sin diferencias estadísticas (Tukey 0.05).

Cuadro2. Medias del número de ninfas de *D. citri* por brote bajo el efecto de diferentes tratamientos en condiciones de campo

Tratamiento	Número de Aplicaciones											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	01/11*	15/11	22/11	6/12	20/12	27/12	21/01	31/01	14/02	28/02	14/03	21/03
Ma198	3.40 a	1.90 b	2.09 b	1.59 b	1.97 a	1.93 a	2.09 b	1.71 b	1.67 b	1.82 a	1.71 b	1.59 b
Bb249	2.19 b	1.82 b	2.31 ab	1.84 ab	1.83 a	1.72 b	2.33 b	1.66 b	1.74 b	1.86 a	1.97 ab	2.22 a
Aceite	3.15 a	3.21 a	2.62 ab	2.09 a	2.05 a	2.04 a	4.26 a	3.07 a	2.16 a	2.05 a	2.26 a	1.25 c
Químico	1.09 c	1.78 b	2.88 a	2.10 a	2.21 a	1.98 a	1.97 b	1.59 b	1.49 b	1.35 b	1.68 b	1.12 c
SC trat.	33.24	14.25	3.61	1.78	5.33	0.58	34.90	15.08	2.47	2.69	2.20	3.53
SC error	17.19	13.34	10.29	4.77	0.76	5.99	5.94	5.04	2.44	2.23	2.69	2.88
F. calculada	23.19	12.82	4.21	4.47	1.13	1.17	70.49	35.86	12.12	14.47	9.85	30.11
Pr>F	0.0087	0.0001	0.0029	0.0003	0.3491	0.0003	0.0004	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
CV	28.07	27.87	21.56	19.06	23.44	21.23	15.24	18.62	14.74	14.02	14.31	18.28

GL trat.=3; GL error 36. Datos transformados con $\sqrt{x+1}$. *Promedios entre columnas con la misma letra sin diferencias estadísticas (Tukey 0.05)

223

Literatura Citada

- Alemán, J., Baños, H. y J. Ravelo 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad Huanglongbing: una combinación destructiva para la producción citrícola. *Protección Vegetal*, 22: 154-165.
- Díaz, F. S. 2011. Susceptibilidad de ninfas y adultos de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) a los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Cordyceps bassiana* (Ascomycetes) en laboratorio. Seminario de Investigación II. FCBA Universidad de Colima. 13 p.
- Étienne, J., Quilici, S., Marival, D. y A. Franck 2001. Biological control of *Diaphorinacitri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiate* (Hymenoptera: Eulophidae). *Fruits*, 56: 307-315.
- Galván, G. G. 2012. Virulencia de hongos entomopatógenos (Hyphomycetes) sobre ninfas y adultos de *D. citri* (Hemiptera: Psyllidae). Seminario de Investigación II. FCBA Universidad de Colima. 13 p.
- Halbert, S. E. y K. L. Manjunath 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist*, 87: 330-353.
- INIFAP. 2012. Red estatal de estaciones agroclimáticas. <http://clima.inifap.gob.mx/redinifap/historicos.aspx?est=36754&edo=6&m=1&an=2012>. Consultado el 5 de abril de 2012.
- Lezama-Gutiérrez, R., Molina-Ochoa, J., Chávez-Flores, O., Ángel-Sahagún, C.A., Skoda, S. R., Reyes-Martínez, G., Barba-Reynoso, M. y O. Rebolledo-Domínguez 2012. Use of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* and *Isaria fumosorosea* to control *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Persian lime under field conditions. *International Journal of Tropical Insect Science*, 32: 39-44.
- Meyer, J. M., Hoy, M. A. y D. G. Boucias 2007. Morphological and molecular characterization of a *Hirsutella* species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95:101-109.
- Miranda, I., Heyker, B., María, A. M. y J. Alemán 2008. Modelo teórico de la interacción de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) con sus enemigos naturales. *Protección Vegetal*, 23(2): 126-130.
- Qureshi, J. A., Kostyk, B. y P. A. Stansly 2009. Control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) with foliar and soil-applied insecticides. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 122: 189-193.
- Roy, H. E., Steinkraus, D. C., Eilenberg, J., Hajek, A. E. y J. K. Pell 2006. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod host. *Annual Reviews of Entomology*, 51: 331-357.
- SAS. 1997. "SAS/STAT User's Guide," release 6.10 ed. SAS Institute, Inc; Cary, North Carolina.
- SENASICA. 2011. Acciones contra el Huanglongbing o "HLB". Informe mensual. Dirección de protección fitosanitaria. Disponible en: www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?iddocumento. Consultado el 10 de agosto de 2012.
- Sun, M. H. y X. Z. Liu 2006. Carbon requirements of some nematophagus, entomopathogenic Hyphomycetes as fungal Biocontrol agents. *Mycopathology*, 161: 295-305.
- Stauderman, K., Avery, P., Aristizábal, L. y S. Arthurs 2012. Evaluation of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Biocontrol Science Technology*, 22: 747-761.
- Watson, D. W., Geden, C. J., Long, S. J., y D. A. Rutz 1995. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae) *Biological Control*, 5: 405-411. 1995.