



**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO**  
**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA CUENCA DEL PAPALOAPAN**

**SUSCEPTIBILIDAD DE *Diaphorina citri* VECTOR DEL HLB A  
INSECTICIDAS EN EL ESTADO DE VERACRUZ**

**Tesis que presenta:**

**IBARRA AVENDAÑO MARLEN**

**Como requisito parcial para obtener el título de:**

**INGENIERÍA EN AGRONOMÍA**

**Tuxtepec, Oaxaca.  
Marzo de 2018**



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE  
LA CUENCA DEL PAPALOAPAN



COLEGIO DE POSTGRADUADOS  
CAMPUS VERACRUZ

SUSCEPTIBILIDAD DE *Diaphorina citri* VECTOR DEL HLB A  
INSECTICIDAS EN EL ESTADO DE VERACRUZ

MARLEN IBARRA AVENDAÑO

No. de control: 13810002

ASESOR INTERNO:  
M.E. HERMINIA DOMÍNGUEZ PALMEROS

ASESOR EXTERNO:  
DR. JUAN ANTONIO VILLANUEVA JIMÉNEZ

PERIODO DE REALIZACIÓN:

JULIO – MARZO 2018

SAN BARTOLO, TUXTEPEC, OAX. MARZO 20

El presente proyecto de tesis, de la C. Marlen Ibarra Avendaño denominado SUSCEPTIBILIDAD DE *Diaphorina citri* VECTOR DEL HLB A INSECTICIDAS EN EL ESTADO DE VERACRUZ, que se desarrolló en el Colegio de Postgraduados Campus Veracruz, fue revisado y aprobado por el:

ASESOR INTERNO



M.E. HERMINIA DOMÍNGUEZ PALMEROS

ASESOR EXTERNO



DR. JUAN ANTONIO VILLANUEVA JIMÉNEZ



MARZO DE 2018

El presente proyecto de tesis, de la C. Marlen Ibarra Avendaño, denominado SUSCEPTIBILIDAD DE *Diaphorina citri* VECTOR DEL HLB A INSECTICIDAS EN EL ESTADO DE VERACRUZ, que se desarrolló en el Colegio de Postgraduados Campus Veracruz, fue revisado y aprobado para su impresión por el Honorable jurado integrado por:

PRESIDENTE

M. E. HERMINIA DOMÍNGUEZ PALMEROS



SECRETARIO

C. ING. MARGARITO PERALTA CRUZ



VOCAL

C. ING. ENRIQUE CAVAZOS ARIZPE



MARZO DE 2018

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto Tecnológico de la Cuenca del Papaloapan, por la formación académica; a todos los maestros que, de manera directa o indirecta, fueron partícipes de este proceso, gracias a todos ustedes.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, por permitirme desarrollar mi residencia profesional dentro de sus instalaciones.

A mis asesores:

Dr. Juan A. Villanueva, por haberme aceptado como integrante de su equipo de trabajo, muchas gracias por la paciencia con la que atendió todas mis dudas y por compartir parte de sus conocimientos.

A la M.E. Herminia Domínguez, por su apoyo y el amor con el que me atendió en la revisión de mi tesis, pero sobre todo por la motivación que me brindó en el transcurso de la carrera.

## **DEDICATORIAS**

Son pocas las personas que logran entrar en nuestras vidas, es por esta razón que es necesario mencionarlas:

A mi abuela, mamá y compañera de vida, sin tu apoyo simplemente no hubiera llegado hasta el lugar donde estoy ahora. Admiro tu tenacidad, valentía y coraje, gracias por enseñarme que la vida no es fácil, por los valores y por haber forjado en mí, ese carácter fuerte que nos caracteriza. Mami agradezco la confianza que desde muy niña me brindaste, solo tú sabes lo mucho que me ha costado llegar hasta aquí y que, a pesar de muchas carencias, un hogar nunca me hizo falta.

A mis compañeros de trabajo y amigos: a la M. C. Sherell, mi completa admiración, gracias por darme un lugarcito en tu enorme corazón; a la M.C. Rosaura, mi completa admiración y respeto; al M.C. Alejandro por compartir sus conocimientos; a Don Santos Escalante, mi amigo, por hacer más ameno el trabajo arduo de invernadero; a mis tíos por creer en mí; a mis mejores amigos, Abigail y Ricardo, ustedes fueron pieza importante de este logro, gracias por guiarme en el camino correcto.

Arturo, gracias por estar con amor en los momentos más difíciles que he pasado en este último año, siempre recordaré esa frase que me dijiste “Si te está costando, es porque vas por buen camino”.

## CONTENIDO

	Página
<b>GLOSARIO DE SIGLAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
1.2.1. Objetivo General .....	5
1.2.2. Objetivos Específicos .....	5
<b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. LIMA PERSA (<i>Citrus latifolia</i> Tan.).....</b>	<b>8</b>
<b>2.2. <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3. IMPORTANCIA DE <i>D. citri</i> .....</b>	<b>9</b>
2.3.1. Daños Directos e Indirectos .....	9
2.3.1.1. Daños directos.....	9
2.3.1.2. Daños indirectos.....	10
2.3.2. Clasificación Taxonómica de <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama .....	10
2.3.2.1. Plantas hospederas de <i>D. citri</i> .....	10
2.3.3. Distribución Geográfica .....	11
2.3.4. Ciclo Biológico de <i>D. citri</i> .....	12
2.3.4.1. Huevo.....	13
2.3.4.2. Ninfa.....	13
2.3.4.3. Adulto.....	13
<b>2.4. EL HUANGLONGBING O HLB.....</b>	<b>14</b>
<b>2.5. ÁREAS REGIONALES DE CONTROL .....</b>	<b>15</b>

2.5.1. Insecticidas para el Control de <i>D. citri</i> .....	16
2.5.2. Aceites en el Control de <i>D. citri</i> .....	17
2.5.2.1. Akaroil.....	17
2.5.2.2. Citroil. ....	19
<b>2.6. RESISTENCIA A INSECTICIDAS .....</b>	<b>22</b>
2.6.1. Susceptibilidad de <i>D. citri</i> a Insecticidas.....	22
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. MATERIALES.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2. MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.2.1. Mantenimiento de la Cría de <i>D. citri</i> .....	26
3.2.2. Bioensayos .....	29
3.2.2.1. Preparación del aditamento para el bioensayo. ....	29
3.2.2.2. Preparación de las dosis.....	30
3.2.2.3. Ventana biológica.....	32
3.2.2.4. Respuesta de la ventana biológica. ....	32
3.2.2.5. Análisis Estadístico.....	33
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1. COMPARACIÓN DE CITROIL CON AKAROIL .....</b>	<b>38</b>
4.1.2. Análisis cromatográfico de Citroil y Akaroil. ....	39
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>5.2. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>43</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>49</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación taxonómica del psílido asiático de los cítricos...	11
Cuadro 2. Materiales utilizados para los bioensayos de <i>D. citri</i> .....	24
Cuadro 3. Dosis de Citroil para su uso en Bioensayos con <i>D. citri</i> .....	30
Cuadro 4. Dosis de Akaroil para su uso en Bioensayos con <i>D. citri</i> .....	31
Cuadro 5. Comparación de las DL <sub>50</sub> .....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo biológico de <i>D. citri</i> .....	13
Figura 2. Localización del municipio de Cuitláhuac y sus colindancias..	22
Figura 3. Localización del Colegio de Postgraduados Campus Veracruz..	23
Figura 4. DL <sub>50</sub> de Citroil col. Campus Veracruz.....	33
Figura 5. DL <sub>50</sub> de Akaroil col. Campus Veracruz.....	34
Figura 6. DL <sub>50</sub> de Citroil col. Cuitláhuac.....	35
Figura 7. DL <sub>50</sub> de Akaroil col. Cuitláhuac.....	35
Figura 8. Susceptibilidad de adultos de <i>D. citri</i> a Citroil y Akaroil.....	37
Figura 9. Región del traslapo de Citroil y Akaroil en el cromatograma.....	39

## GLOSARIO DE SIGLAS

<b>SIGLAS</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
<b>ARCOS</b>	Áreas Regionales de Control
<b>CLas</b>	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal para el 50% de la población
<b>FR</b>	Factor de Resistencia
<b>HLB</b>	Huanglongbing o Dragón Amarillo
<b>LC</b>	Límite de Confianza
<b>LF</b>	Límite Fiducial
<b>PAC</b>	Psílido Asiático de los Cítricos
<b>R</b>	Repetición
<b>T</b>	Testigo

## RESUMEN

El uso adecuado de insecticidas permite obtener un control apropiado de la plaga, además evita aplicaciones innecesarias y el desarrollo de resistencia a estos productos. Los insecticidas Citroil y Akaroil pertenecen al grupo toxicológico de los aceites minerales y han sido recomendados para el control del psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). Se determinaron los valores de Dosis Letal Cincuenta (DL<sub>50</sub>) de Citroil y Akaroil en adultos de dos diferentes colonias de este insecto. La colonia establecida en un invernadero del Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, no ha sido expuesta a insecticidas por más de cinco años. La colonia de campo fue colectada en huertas de lima Persa bajo constante aplicación de diferentes insecticidas, en el municipio de Cuitláhuac, Veracruz. Se utilizó un bioensayo tópico en adultos de *D. citri* con el insecticida disuelto en acetona. El testigo sólo recibió acetona. Se utilizaron 120 insectos por dosis en cinco repeticiones. Se obtuvieron las líneas de regresión logaritmo dosis-Probit con la mortalidad corregida a cada dosis utilizada. Con base en las DL<sub>50</sub> de Citroil y Akaroil, se determinó que no existe diferencias de susceptibilidad en ambas colonias. Sin embargo, resaltó que se requirieron dosis muy por encima de las recomendadas para lograr mortalidades superiores al 80%, lo cual confirma que estos productos no deben ser recomendados como insecticidas dirigidos a adultos.

## **ABSTRACT**

The proper use of insecticides allows to obtain an appropriate control of the pest and avoid unnecessary applications and the development of resistance to these products. Citroil and Akaroil insecticides belong to toxicological group of mineral oils and have been recommended for the control of the Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*). Lethal Dose Fifty (LD<sub>50</sub>) values were determined for Citroil and Akaroil in adults of two different colonies of this insect. The colony established in the greenhouse of Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz has not been exposed to insecticides for more than five years. The field colony was collected in Persian lime orchards under constant application of different insecticides, in the municipality of Cuitlahuac, Veracruz. A topical bioassay was used in adults of *D. citri* with the insecticide diluted in acetone. The control only received acetone. One hundred insects were used for each of five replicates. Logarithm dosis-Probit regression lines were obtained with corrected mortality and each dose used. Based on the LD<sub>50</sub> of Citroil and Akaroil, no difference was found in the susceptibility of both colonies. However, it was evident that higher than the recommended doses were required to reach mortalities greater than 80%, which indicates that these products are not appropriate as insecticides targeting adults.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los cítricos representan el 22% de la producción mundial de frutas. Desafortunadamente, la citricultura se está viendo amenazada por el Huanglongbing (HLB), mejor conocido como amarillamiento de los cítricos, enfermedad transmitida por el psílido asiático de los cítricos (PAC) *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). Al alimentarse de las plantas, el PAC trasmite la bacteria *Candidatus Liberibacter spp.* (CLas), agente causal del HLB (Torres *et al.*, 2013). Ésta es reconocida actualmente como la enfermedad más devastadora a nivel mundial (Bové, 2012).

La primera incidencia del PAC se detectó en India, en una especie de *Murraya* y fue descrita por primera vez en Taiwan, en 1907. De simple fitófago hoy es de importancia cuarentenaria (OPEPP/EPPO, 1988). Se dispersó y estableció en diversas áreas cítricas del mundo. Se ha reportado que el HLB causó la muerte de más de 63 millones de árboles, principalmente en Asia, Sudáfrica y Brasil (Halbert y Manjunath, 2004; Bové, 2006).

La primera detección de HLB en el Continente Americano fue en el año 2004, en el estado de Sao Paulo, Brasil. Desde su confirmación en Florida, E.U.A., en 2005, la dispersión de la enfermedad y su vector ha sido considerablemente rápida a través del Caribe, de América Central y de América del Norte (Gottwald, *et al.*, 2007; citado por Díaz-Zorrilla, *et al.*, 2014).

De acuerdo con FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014), México es el mayor productor de limas y limones a nivel mundial.

El problema del HLB y su vector PAC se detectó por primera vez en julio de 2009 en árboles de limón mexicano de la península de Yucatán. En el 2010 ya se había reportado la presencia de esta enfermedad en los estados de Nayarit, Jalisco y Colima. Para 2014 ya se había diseminado en 14 de los 23 estados citrícolas del país. Según datos de SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria), el impacto económico y social estimado del HLB asciende a la pérdida de 1.7 millones de toneladas y 11.2 millones de jornales. La asociación del PAC y el HLB han puesto en riesgo a más de 67 000 productores de cítricos de México, que concentran una producción de más de 7 millones, con valor aproximado de 10.2 mil millones de pesos (SENASICA, 2014).

El primer lugar en producción de cítricos lo ocupa Veracruz con 227 352 ha, principalmente en naranja, limón, tangerina, toronja y mandarina. Esto beneficia a 15 mil familias, además de generar al año cerca de 10 millones de jornales en las labores del cultivo, industrialización y comercialización de sus productos. Ahora son los más afectados por la enfermedad del HLB, en el estado (SENASICA, 2012; SIAP, 2012).

Dentro de los municipios citrícolas del estado destacan Martínez de la Torre, seguido por el municipio de Cuitláhuac, con una superficie sembrada de 1 206 ha, y una superficie cosechada de 1 151 ha, que representa 17 602 t con un valor de 89.94 millones de pesos (SEFIPLAN, 2013).

La citricultura en el estado de Veracruz se ha visto afectada por diversas enfermedades, dentro de las más perjudiciales se encuentra el Huanglongbing, causado por la bacteria *Candidatus Liberibacter spp.*, lo que ha provocado pérdidas económicas.

Para frenar la expansión de la enfermedad, el gobierno de México, igual que lo han hecho otros países, ha impulsado un programa de control basado en tres estrategias: el control químico del vector (PAC) en Áreas Regionales de Control (ARCOs), la producción y uso de plantas certificadas y la eliminación de árboles infectados en el momento de su detección (SENASICA, 2014; Lewis *et al.*, 2015).

Sin embargo, una práctica común entre los productores es la aplicación inmoderada de varias materias activas insecticidas cada temporada (Boina *et al.*, 2009). En la actualidad se diagnostica que el desarrollo de resistencia a diferentes ingredientes activos vaya en incremento en los próximos años. De acuerdo con Tiwari y colaboradores (2012) el PAC puede sobrevivir a varias aplicaciones de insecticidas, principalmente, los psílidos que presentan al menos un mecanismo de resistencia, derivado de la aplicación intensiva de insecticidas para el control de plagas en cítricos. Es por esto que para manejo integrado de plagas es importante detectar cambios tempranos en la susceptibilidad a los insecticidas en uso en poblaciones de campo, de esta manera evitar aplicaciones innecesarias y alargar la vida útil de los insecticidas (Georghiou y Taylor, 1986; Díaz-Zorrilla, *et al.*, 2011). Esta detección temprana favorece aplicar medidas opcionales de control y sirve de base de los programas de control químico de una determinada plaga o vector.

Actualmente se han publicado varios trabajos, tanto en México como en otras partes del mundo, en los que se reportan estimaciones de resistencia del PAC a ingredientes activos químicos (Tiwari, *et al.*, 2011; 2015; García-Méndez, *et al.*, 2016). Esto detonó la preocupación de un programa de detección de la resistencia asociado a la Campaña contra el HLB y su Vector en México.

Como parte de la Campaña Nacional contra el HLB y su Vector, los Comités Técnicos estatales para el manejo de *D. citri* Kuwayama se encargan de recomendar los productos que, a su juicio, son los más aptos para reducir las poblaciones de PAC. Estas recomendaciones se incorporan en los programas de trabajo de la Campaña a Operar con recursos del Componente de Sanidad del Programa Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria 2015. Entre los insecticidas más recomendados por los Comités Técnicos estatales para el manejo de *D. citri* Kuwayama destacan los aceites minerales o refinados del petróleo, los que se están usando con mayor frecuencia. Por tal motivo se evalúa la efectividad de los aceites Citroil y Akaroil.

El objetivo de esta investigación es conocer si existen similitudes o diferencias en el comportamiento de dos poblaciones de *D. citri* Kuwayama, una proveniente de campo, a la que se le denomina “Colonia Cuitláhuac” y otra, establecida en invernadero, identificada como “Colonia Campus Veracruz” ante la aplicación de dos insecticidas suaves, del grupo toxicológico de los aceites minerales, para determinar la dosis del producto más eficaz en el control del insecto plaga.

## **1.2. OBJETIVOS**

### **1.2.1. Objetivo General**

Determinar si existe resistencia o susceptibilidad a dos insecticidas recomendados para el control de las poblaciones de *D. citri* Kuwayama en el municipio de Cuitláhuac, Veracruz a través de bioensayos de acción tóxica, con muestras colectadas de campo e invernadero.

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

- Mantener de la cría de *D. citri* Kuwayama procedente de la región Central Costera de Veracruz, establecidas sobre lima Persa en invernadero.
- Determinar mediante bioensayo tóxico, la dosis de Citroil y Akaroil que eliminan al 50% de la población de adultos de *D. citri* Kuwayama.
- Comprobar si una población de adultos de *D. citri* Kuwayama colectada en Cuitláhuac, Veracruz, tiene la misma respuesta de susceptibilidad al Citroil y Akaroil, comparada con la colonia criada en invernadero en el Campus Veracruz, sin exposición a insecticidas y otra colonia de campo a la cual se le denomino colonia Cuitláhuac

## 2. MARCO TEÓRICO

El origen de los cítricos se remonta a hace 20 millones de años, en el Sudoeste Asiático, Persia (Irán) o Malasia. A partir de ahí fue llevado a España y al Norte de África durante la Edad Media y con las cruzadas. Al transcurso de los años se ha ido extendiendo por todo el mundo y han dado lugar a diferentes variedades.

La lima Persa es una especie de cítricos que ha mantenido un continuo crecimiento en México durante los últimos 30 años, a una tasa promedio anual de 13%. Esto se debe a la gran demanda de mercados como el de Estados Unidos, Europa y Japón, responsables de absorber el 60% de la producción nacional. En 1997, México cosechó 20 620 ha de lima Persa y exportó 242 mil t, lo que colocó al país como principal productor y exportador de esta fruta en el mundo.

La citricultura, se ve amenazada por alrededor de 74 especies de artrópodos perjudiciales, como la negrilla o arador, mosca mexicana de la fruta, mosca prieta, diversas especies de mosca blanca y trips, representan comúnmente las especies de mayor importancia (López *et al.*, 2005). No obstante, en la actualidad la principal amenaza de la industria citrícola es la presencia de *Diaphorina citri* Kuwayama, principalmente porque es vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter spp.*, causante del Huanglongbing (HLB), estimada la peor enfermedad de los cítricos (Capoor, *et al.*, 1974; Da Graca, 1991); además, este insecto causa daños

directos al cultivo cuando se encuentra presente en altas densidades poblacionales.

### **2.1. LIMA PERSA (*Citrus latifolia* Tan.)**

La lima Persa, conocido en otros países como lima Tahití, también es llamada de forma inadecuada limón Persa o limón sin semilla. Ha adquirido una enorme importancia económica durante los últimos 20 años en México.

En México se comercializa como fruta fresca, con lo que proporciona al consumidor valor nutricional y medicinal, así como una diversidad de productos y subproductos que se obtienen en el proceso de industrialización.

### **2.2. *Diaphorina citri* Kuwayama**

Esta especie fue descrita a partir de cítricos en Shinchiku, Taiwán en 1907, lo que se publicó en un volumen doble en 1908. Las especies de *Diaphorina* usualmente son separadas con base en el patrón de coloración en las alas anteriores y la forma de los conos genales. *Diaphorina citri* Kuwayama tiene un patrón en las alas anteriores que se puede distinguir con facilidad de la mayoría de otras especies del psílidos que afectan a los cítricos y sus relativos (Halbert y Manjunath, 2004).

### **2.3. IMPORTANCIA DE *D. citri***

De la citricultura dependen miles de familias y genera millones de jornales en las labores de cultivo, industrialización y comercialización de sus productos. De este panorama parte la importancia de realizar acciones preventivas, y evitar que el HLB se disperse en el estado, lo que podría afectar en forma severa los ámbitos laboral, económico y social de no hacer algo al respecto.

#### **2.3.1. Daños Directos e Indirectos**

Los daños ocasionados por *D. citri* Kuwayama se pueden clasificar en directos cuando el insecto se alimenta de la planta, e indirectos cuando trasmite la bacteria causante de la enfermedad denominada Huanglongbing.

**2.3.1.1. Daños directos.** El insecto al alimentarse extrae grandes cantidades de savia de las plantas, las ninfas segregan una mielecilla que favorece la aparición de varias especies de hongos productores de la fumagina. Este hongo saprófito provoca efectos negativos en la fotosíntesis, al bloquear directamente la entrada de luz. La fumagina puede presentarse como manchas en la fruta, lo que disminuye su calidad y precio. Durante su alimentación, el insecto inyecta toxinas a la planta las que interrumpen el desarrollo de brotes nuevos y provocan deformaciones en las hojas. Una sola ninfa al alimentarse por menos de 24 h, es capaz de provocar una malformación en hojas jóvenes como maduras. La madurez de los árboles también influye en la tolerancia de los daños; la pérdida de hojas es mínima en árboles mayores, en

comparación con aquellos con tamaño de la copa menor (Alemán, *et al.*, 2007).

**2.3.1.2. Daños indirectos.** El principal daño de *D. citri* Kuwayama en México lo ocasiona al transmitir la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, que causa la enfermedad del HLB. El psílido puede transmitir el patógeno con una eficiencia del 1%. Se les asigna este rol a las ninfas de cuarto, quinto instar y adultos, quienes son los que adquieren la bacteria patógena después de haberse alimentado de la planta enferma durante 30 min o más. Entonces la bacteria permanece latente al interior del insecto en los siguientes 3 a 20 días, momento en el que se le puede detectar en las glándulas salivales. Una vez que el insecto haya adquirido la bacteria, es capaz de transmitirlo toda su vida, sin embargo, no puede pasar a la progenie a través de los huevos. También se transmite por el injerto de yemas infectadas con la enfermedad (Alemán, *et al.*, 2007).

### **2.3.2. Clasificación Taxonómica de *Diaphorina citri* Kuwayama**

En el Cuadro 1 se presenta la clasificación taxonómica del PAC, vector del Huanglongbing.

**2.3.2.1. Plantas hospederas de *D. citri*.** La Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-047-FITO (2009) menciona que *D. citri* Kuwayama tiene preferencia por la familia de las Rutáceas. Especialmente afecta a los cítricos, en los que destacan la naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm Swingle), limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lushington), naranja agria (*Citrus aurantium* L.), pomelo (*Citrus*

*grandis*), Toronjo (*Citrus paradisi* Macfad). También existen hospederos alternativos, como el género *Murraya spp.* (*Murraya paniculata* L. Jack)

### **2.3.3. Distribución Geográfica**

Actualmente, el PAC es un insecto plaga con categoría cuarentenaria (OEPP/EPPO, 1988) que está establecido ampliamente en las zonas citrícolas del mundo (Catling, 1970:8-15; Wooler, *et al.*, 1974: 93-94; CABI/EPPO, 2001; EPPO, 2005).

En México, el PAC fue encontrado en el año 2002 en los estados de Campeche y Quintana Roo. A partir de ahí se ha distribuido ampliamente en todas las áreas citrícolas del país. En 2003, se observó en los estados de Nuevo León y Tamaulipas; para el año 2004, la plaga se había extendido hasta los estados de Colima, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Yucatán (López, *et al.*, 2005).

Durante el año 2005, se registró en Sinaloa; en 2006 el insecto también se localizó en Sonora y Baja California Sur (Martínez, 2008). En junio de 2008, se reportó la presencia de este insecto en la zona urbana de Tijuana, Baja California, (Dirección General de Sanidad Vegetal y Sistemas de Alerta Fitosanitaria de la NAPPO 2008). En tan solo seis años, de 2002 a 2008, el insecto se desplazó por todo el territorio nacional. Durante julio de 2008, el insecto fue observado alimentándose en árboles dispersos y escasos en jardines del área rural del estado de Coahuila, lejos de cualquier zona citrícola (López, *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del psílido asiático de los cítricos (Ortiz, *et al.*, 2014).

<b>Categoría</b>	<b>Nombre del taxón</b>
Reino	Animalia
Phylum	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Hemiptera
Suborden	Sternorrhyncha
Superfamilia	Psylloidea
Familia	Liviidae
Género	<i>Diaphorina</i>
Especie	<i>Diaphorina citri</i> Kuwayama
Sinonimia	<i>Euphalerus citri</i> Kuwayama

#### **2.3.4. Ciclo Biológico de *D. citri***

Las hembras de esta especie colocan los huevos en grupos, sobre los ápices y hojas sin expandir de brotes en crecimiento. La duración del periodo embrionario varía de 7 a 9 días a 15 °C y se reduce a 3.5 días a 28 °C. Las ninfas se alimentan y desarrollan sobre brotes en crecimiento, las que en general son poco móviles y tienden a vivir en grupo sobre los brotes. La duración del ciclo total puede variar entre 15 y 47 días, dependiendo de la temperatura. Las temperaturas óptimas para el desarrollo del insecto se encuentran entre 25 y 28 °C. Los adultos sobreviven dos meses e incluso períodos mayores. La fluctuación de las poblaciones del insecto está fuertemente correlacionada con la presencia de brotes en cítricos, ya que las hembras oviponen exclusivamente en ellos.

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

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

**2.3.4.3. Adulto.** Generalmente de color marrón. Cabeza ligeramente más estrecha que el tórax, la posición de los adultos durante el reposo es una característica, con la cabeza prácticamente pegada al sustrato y la punta del abdomen hacia arriba en un ángulo de 30° aproximadamente. Antenas con los dos segmentos basales color marrón, segmentos 3° a 8° amarillentos con ápices de los segmentos 4°, 6°, 8° y últimos dos segmentos negros, la longitud de la antena es de 0.48 mm Ojos marrón oscuro. Pronoto con apariencia de caucho, redondeado y débilmente sinuoso anteriormente con dos foveas impresas sobre cada lado (Vargas, 2013). El macho es levemente más pequeño que las hembras, la longitud del cuerpo del macho oscila entre 1.53 a 1.66 mm; mientras que la hembra

oscila entre 1.90 a 2.06 mm. El segmento basal del edeago del macho es curvo, con el ápice del segmento apical dirigido dorsalmente. La hembra presenta una terminalia alargada. Los adultos tienen poca capacidad para mantener vuelos muy largos cuando son perturbados saltan rápidamente (Darderes, 2009) (Ver Figura1).

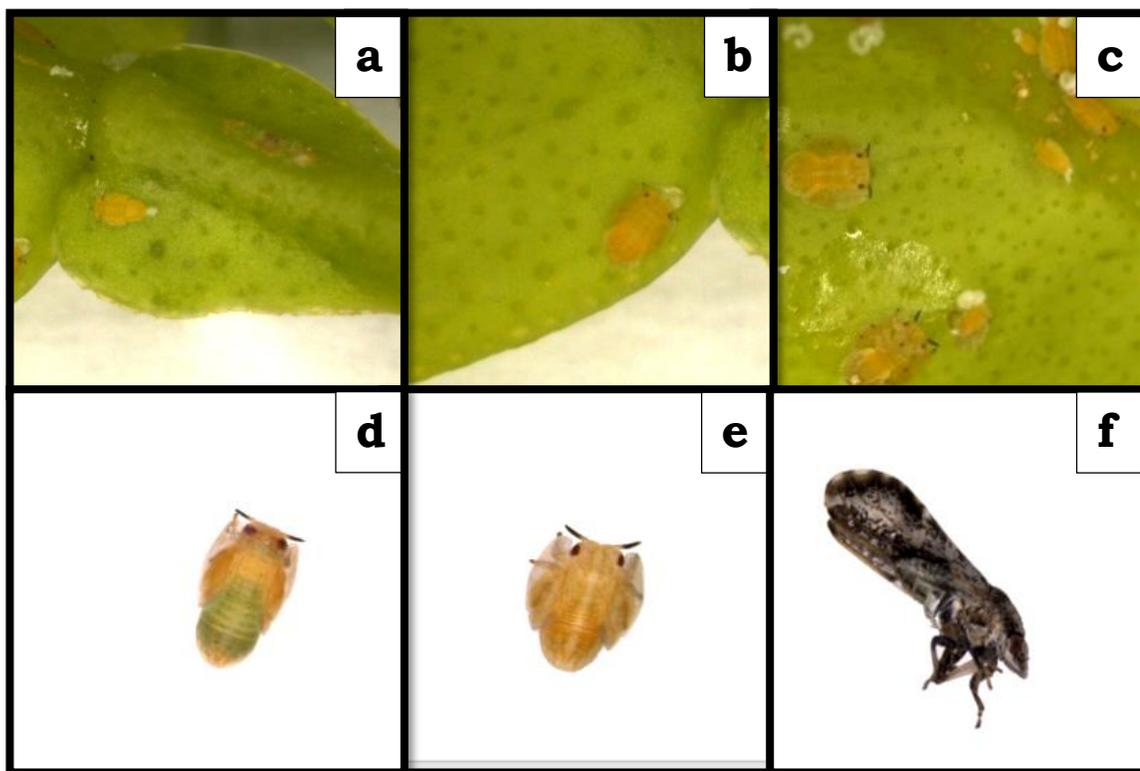


Figura 1. Ciclo biológico de *D. citri*. a) ninfa 1, b) ninfa 2, c) ninfa 3, d) ninfa 4, e) ninfa 5, f) adulto. Fuente: Elaboración propia. Fotografía: Sherell Zamora.

#### 2.4. EL HUANGLONGBING O HLB

Esta enfermedad es inducida por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs). Fue introducida al continente americano por el PAC en

el año 2004 en Sao Paulo, Brasil. En 2005 se confirma la presencia de PAC y la enfermedad en Florida, EUA, donde a consecuencia de la velocidad de diseminación, ha tenido efectos devastadores. En México, se tiene registro de esta enfermedad en el año 2009 en la península de Yucatán. Actualmente ya se ha extendido a los otros estados citrícolas de la República Mexicana. Hasta la fecha no existen métodos directos para el control de este patógeno, razón por la que se están llevando a cabo actividades de control de PAC y aislamiento del HLB. Representa una seria amenaza para las miles de hectáreas de cítricos establecidas en el país, lo que afecta a la producción y economía de las personas que se dedican a la citricultura. El control químico del PAC, junto con la producción de plantas certificadas bajo invernadero y la eliminación de árboles infectados son procedimientos que están siendo empleados para la reducción del HLB (Bové, 2012).

## **2.5. ÁREAS REGIONALES DE CONTROL**

Las áreas regionales de control (ARCOs), tienen como objetivo la aplicación en periodos convenientes de acuerdo al ciclo biológico de la *D. citri* y las épocas de brotación de los cítricos el control químico y/o biológico en áreas con una extensión de por lo menos 1 000 ha compactas cada una. Tienen el propósito de mantener las poblaciones del insecto lo más bajas posibles e inducir la participación coordinada de los productores en esta actividad, para disminuir y retardar la diseminación de la bacteria entre plantas, huertas y regiones citrícolas. En los ARCOs, los Comités Técnicos para el manejo del HLB tienen la responsabilidad de recomendar los productos a utilizar en las diferentes épocas de brotación, a partir de investigaciones realizadas (Villanueva-Jiménez, *et al.*, 2010).

Sin embargo, la práctica común entre los productores es la aplicación indiscriminada de varias materias activas insecticidas cada temporada (Boina, *et al.*, 2009). Ante la situación actual se prevé que el desarrollo de resistencia a diferentes ingredientes activos aumente considerablemente en los próximos años. Tiwari, *et al.* (2012) documentaron que el PAC puede sobrevivir a la aplicación de varios insecticidas, principalmente los que comparten al menos un mecanismo de resistencia y que fueron utilizados de manera intensiva anteriormente para controlar otras plagas de cítricos. En el manejo integrado de plagas es importante detectar cambios tempranos en la susceptibilidad a los insecticidas en uso en poblaciones de campo y así evitar aplicaciones innecesarias para alargar la vida útil de los insecticidas disponibles (Georghiou y Taylor, 1986; Díaz-Zorrilla, *et al.*, 2011).

Esta detección temprana facilita aplicar medidas opcionales de control y es la base de los programas de control químico de una determinada plaga o vector. El objetivo de esta investigación fue determinar la susceptibilidad de una población de *D. citri*, de campo proveniente de Cuitláhuac, Veracruz, comprada con una colonia invernadero denominada Campus Veracruz, para determinar la respuesta relativa de actividad e inferir el desarrollo de resistencia.

### **2.5.1. Insecticidas para el Control de *D. citri***

Debido al carácter masivo de las aplicaciones, se requiere una mayor precisión de selección de los productos aplicados, lo cual favorece el

desarrollo de la resistencia a estos productos por parte de la plaga. Por ello, es esencial realizar el monitoreo de la resistencia a insecticidas.

La aplicación de estos productos en los periodos de brotación es una práctica recomendada para reducir las poblaciones del vector.

### **2.5.2. Aceites en el Control de *D. citri***

En los Programas de Trabajo de la Campaña contra el HLB de los Cítricos, a operar con recursos del Componente de Sanidad del Programa Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria 2015 en los estados donde opera la Campaña, se recomiendan varios insecticidas por los Comités Técnicos para el manejo de *D. citri*. Entre estos productos destacan los aceites minerales o refinados del petróleo. Estos productos se están usando cada vez más, en especial en focos de infección, traspatios y zonas de agricultura orgánica o por interés de bajo uso de productos organosintéticos.

A continuación, se presenta la información del aceite mineral indicado en la ficha técnica de Agrícola Innovación S.A. de C.V.

**2.5.2.1. Akaroil.** Es un aceite mineral formulado con base en solventes de petróleo, su familia química es el ácido benzoico. Se formula como concentrado emulsionable al 98.50% de uso agrícola. Se utiliza a principios de temporada en árboles frutales (cítricos, manzano y peral) para el combate y control de ácaros y escamas.

Akaroil es una mezcla de surfactantes especiales con fito-ablandador (aceite no fitotóxico), el cual posee notable actividad ovicida. Los insectos mueren por hipoxia por lo que es difícil que se desarrolle resistencia.

Las dosis recomendadas para usar Akaroil para el control de *D. citri* en cidro, limón, naranja, pomelo, toronja y lima, son las siguientes: de 10 a 20 ml/L de agua. Se recomienda aplicar el producto a favor del viento, en horas frescas de la mañana o bien por la tarde, nunca realizar aplicaciones a pleno sol, ya que el producto no podrá actuar de manera correcta y será evaporado rápidamente por el sol; no aplicar antes de una lluvia. Calibre el equipo de aplicación antes de comenzar la jornada. Utilice boquillas adecuadas. Respete las dosis y épocas de aplicación.

Para preparar el producto debe agitarse el envase antes de usar, calibrar el equipo de aplicación y determinar el volumen de agua necesario para cubrir perfectamente el área a tratar. Para aplicarse, el producto debe ser diluido en agua limpia. Vierta el agua en un recipiente de acero inoxidable, aluminio, fibra de vidrio o plástico, agregue la cantidad recomendada de Akaroil, y agite utilizando un agitador mecánico (nunca con las manos) hasta mezclar perfectamente; si se van a utilizar en la misma aspersión fungicidas, herbicidas o insecticidas, agregue primero el plaguicida y después añada Akaroil, procurando suficiente agitación para asegurar la emulsión homogénea. Adicione la cantidad de agua faltante hasta completar la requerida para la aspersión, posteriormente proceda a asperjar la mezcla.

Las contraindicaciones son las siguientes: no aplicar Akaroil, hasta que hayan transcurrido por lo menos 60 días después de haberse hecho la

aplicación de azufre. En caso de que previamente se hayan hecho aplicaciones de Captán o Carbaril, es aconsejable no aplicar Akaroil si la temperatura es mayor a 35 °C. Tampoco aplique el producto a través de cualquier sistema de riego. No se use este producto con o siguiendo aplicaciones de azufre.

Algunas ventajas del producto son las siguientes: el Akaroil está elaborado en base a hidrocarburos saturados, por lo que es muy estable a la acción de oxígeno y luz solar, puede ser aplicado durante todo el año, puede utilizarse como aditivo para asegurar los rociados con fungicidas, herbicidas o insecticidas, se recomienda su uso en árboles frutales como melocotón, ciruelo, cerezo, en ornamentales, árboles para sombra, coníferas y en nuez. El Akaroil presenta los siguientes beneficios: No es fitotóxico, tiene elevado poder insecticida, no presenta sulfato residuo de 92% mínimo, tiene Registro de EPA.

A continuación, se presenta la información del aceite mineral Citroil indicado en la ficha técnica de Ultraquimia Agrícola, S.A. de C.V.

**2.5.2.2. Citroil.** Es un aceite parafinico agrícola con acción insecticida, formulado a la concentración de 95% para su uso en cultivos de lima, limonero, mandarina, naranjo, pomelo, tangerina y toronjo. Actúa contra las ninfas del PAC. La dosis recomendada es de 0.5 a 1.5 L en 100 L de agua.

Está formulado con aceites básicos refinados, con predominancia de derivados parafínicos y alto contenido de residuos no sulfonados, con emulsificantes que le permiten formar una emulsión estable con el agua. Puede aplicarse solo o combinado con plaguicidas. Tiene acción sinérgica, debido a que al contacto impide el proceso respiratorio de huevecillos, larvas e insectos adultos (sofocación); asimismo, presenta éste mismo efecto, sobre esporas y forma una película protectora sobre las superficies foliares tratadas que previene la entrada de los patógenos.

Para preparar y aplicar el producto, agite el producto antes de usarlo. No lo mezclar con aguas de elevada dureza y acondicione a un pH de 6 a 6.5 para una mejor acción del producto. Se recomienda utilizar recipientes plásticos o de otro material no ionizante. Vierta la cantidad necesaria del producto directamente con la suficiente cantidad de agua, siempre en último orden de adición a los otros insumos que contendrá la mezcla. Es recomendable mantener una agitación constante al momento de la adición para asegurar una mezcla homogénea. Realice las aspersiones cuando se observen oviposiciones próximas a la eclosión, o procure que el producto tenga contacto con los insectos inmaduros o adultos presentes. Asimismo, que el tamaño de gota y presión de aspersión permitan la cobertura de sitios donde se localizan las plagas. Aplique durante la mañana o al atardecer para que la mezcla seque lentamente, para mayor efectividad. La cantidad de agua a utilizar dependerá de la calibración en función del cultivo a asperjar.

Aplique la solución de aspersión que contenga el producto el mismo día de su preparación. Evite aplicar en horas de sol intenso, cuando esté lloviendo y cuando el viento favorezca la deriva (superior a 8 km/h).

Se recomienda aplicar después de realizar el riego, no aplicar en condiciones de estrés hídrico, o por enfermedad y temperaturas extremas fuera del rango de 5 a 25 °C. Preferir las aplicaciones diluidas en vez de las concentradas con nebulizadoras. No es fitotóxico a los cultivos aquí indicados si es aplicado de acuerdo a las recomendaciones de la etiqueta.

El Citroil es compatible con benomilo, imidacloprid, aminoácidos, estreptomicina, oxitetraciclina y cobre. Para las mezclas que se realicen con otros productos se recomienda utilizar los que cuenten con registro autorizado y vigente para el cultivo indicado. Sin embargo, es necesario realizar una prueba de compatibilidad previa aplicación y observar las limitaciones cuando se mezcle con acefato, benomilo, hidróxido de cobre, fenvalerato, mancozeb, maneb, metamidofos, metalaxil, metidation y triadimefon. Se debe evitar el uso de captan, folpet y oxytioquinox durante o después de la aplicación de Citroil. No se debe aplicar propargite dentro de los 30 días después de la aspersión de Citroil. Incompatible con azufre, cobres, captán, carbaril, dimetoato, endosulfán y folpan.

Para prevenir el desarrollo de poblaciones resistentes, siempre respete las dosis y las frecuencias de aplicación; evite el uso repetido del producto, alternándolo con otros grupos químicos de diferentes modos de acción y diferentes mecanismos de detoxificación, y mediante el apoyo de otros métodos de control.

## **2.6. RESISTENCIA A INSECTICIDAS**

La resistencia es definida como el desarrollo de la habilidad para tolerar dosis altas de tóxicos, los cuales resultarían letales a la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie. La OMS (Brown y Pal,1971) la define como el desarrollo de la habilidad en una raza de insectos para tolerar dosis de tóxicos que han probado ser letales a la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie.

### **2.6.1. Susceptibilidad de *D. citri* a Insecticidas**

En el manejo de la resistencia a plagas es de gran importancia porque favorece la detección de cambios tempranos en la susceptibilidad a los insecticidas en uso en poblaciones de campo y así evitar aplicaciones innecesarias para alargar la vida útil de los insecticidas disponibles (Georghiou y Taylor, 1986; Díaz- Zorrilla, *et al.*, 2011). La detección temprana facilita utilizar medidas opcionales de control y es la base de los programas de control químico de una determinada plaga o vector.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de tesis se realizó durante el periodo de julio a diciembre del 2017, en diferentes parcelas del municipio de Cuitláhuac, Veracruz, México, ubicado en las coordenadas  $18^{\circ} 48' 42''$  latitud norte y  $96^{\circ} 43' 22''$  latitud oeste; a una altitud entre 140 y 500 m. Colinda al norte con los municipios de Yanga, Atoyac, Paso del Macho y Carrillo Puerto; al este con los municipios de Carrillo Puerto, Cotaxtla y Tierra Blanca; al sur con los municipios de Tierra Blanca, Omealca y Cuichapa, y al oeste con los municipios de Cuichapa y Yanga (Figura 2).

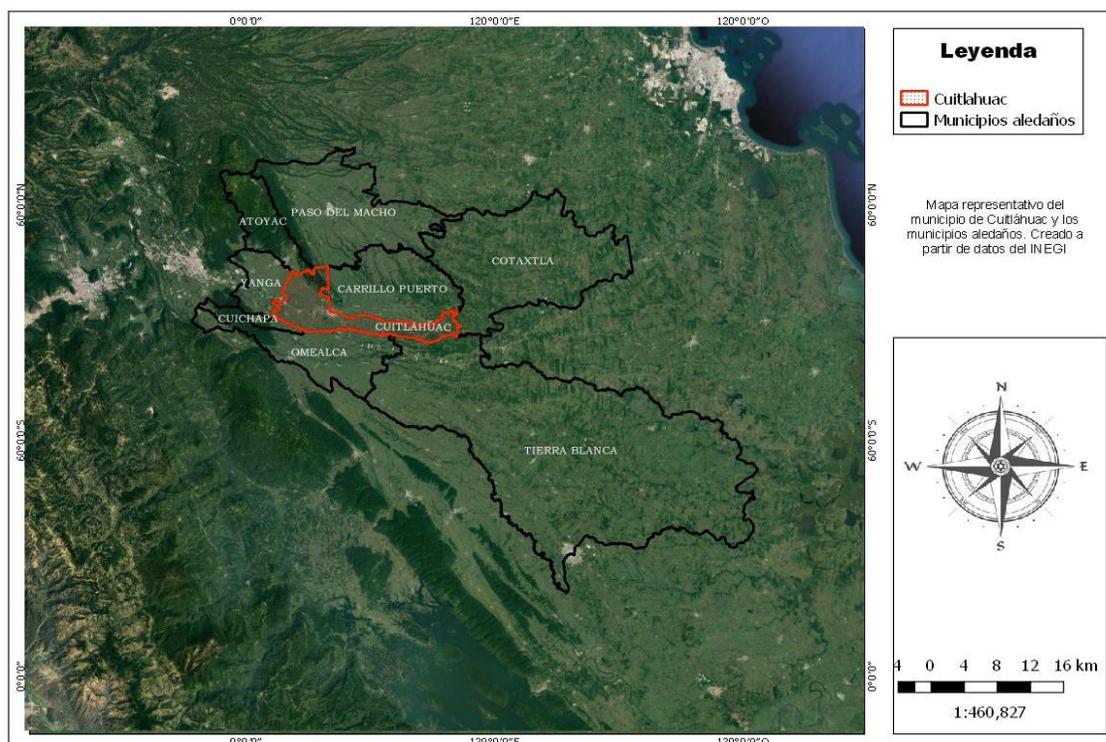


Figura 2. Localización del municipio de Cuitláhuac y sus colindancias.  
Fuente: QGis elaborado por M.C. Alejandro Trejo 2017.

En el laboratorio del Colegio de Postgraduados Campus Veracruz. El cual se encuentra ubicado entre las coordenadas  $19^{\circ}31'45''$  latitud norte y  $96^{\circ}55'13''$  latitud oeste, a 600 metros sobre el nivel del mar; Ubicado en la Carretera Federal Veracruz-Xalapa km. 88.5, Municipio de Manlio F. Altamirano, Veracruz, México, C.P. 91690 (Figura 3).

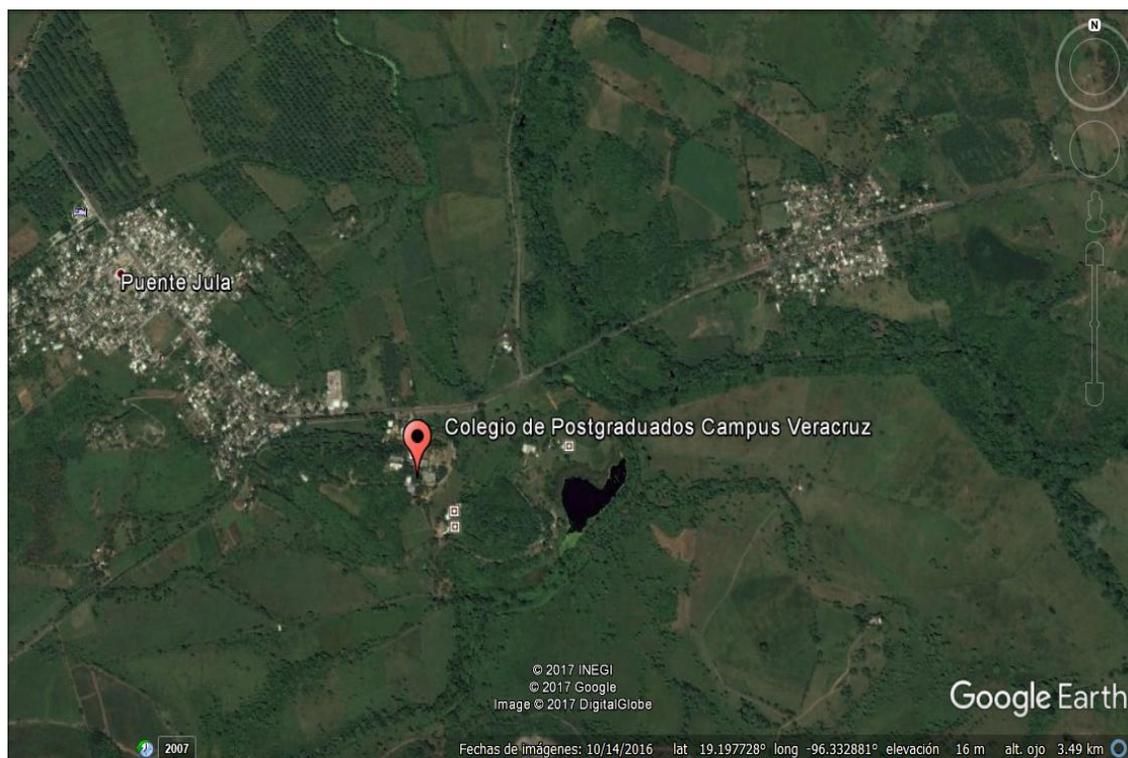


Figura 3. Localización del Colegio de Postgraduados Campus Veracruz.  
Fuente: Google Earth 2016.

### 3.1. MATERIALES

Los materiales utilizados durante el desarrollo de la presente investigación, se muestran en el Cuadro 2:

Cuadro 2. Materiales utilizados para los bioensayos de *D. citri*.

<b>CONCEPTO</b>	<b>MATERIALES Y ADECUACIONES</b>
<b>Invernadero</b>	200 plantas de lima Persa, fertilizadas con: Triple 17 y Osmocote.
<b>Laboratorio</b>	Formato de bioensayos, guantes, cubre bocas, parrilla eléctrica, matraz, vaso de precipitado 250 ml y 1000 ml, agitador magnético, cajas Petri de 4 cm, charolas micro jeringa, microaplicador, sanitas, jeringas de 100 $\mu$ l, viales 10 ml, pipetas de 2, 5 ml y 10 ml, propipetas, pinceles 00, agujas entomológicas, llave perica, pinzas, bolsas herméticas (chicas, medianas y grandes), tijeras, franela, cinta de aislar, lupa, marcador negro Sharpie, espátula, esponja, jabón, hoja Probit.
<b>Reactivos químicos</b>	Acetona grado técnico 99.60%, alcohol etílico al 70%, agar bacteriológico, CO <sub>2</sub> y agua.
<b>Insecticidas</b>	Citroil 95% y Akaroil 98.50%.
<b>Campo</b>	GPS, tubo Eppendorf, mangueras de goma de látex, parafilm, contador de insectos manual, tijeras, cangureras bolsas herméticas chicas, medianas y grandes, viales 10 ml con alcohol, etiquetas, hielera, bolsas de hielo.

### 3.2. MÉTODOS

Para la presente investigación se utilizaron insectos adultos de ambos sexos del género y especie *Diaphorina citri* Kuwayama recién emergidos de una población que no ha sido expuesta a insecticidas, establecida en el invernadero del Colegio de Postgraduados Campus Veracruz, y una población de campo ubicada en el municipio de Cuitláhuac, Veracruz.

La población de *D. citri* establecida en invernadero desde hace cinco años, es procedente de la zona centro del estado, misma que ha sido reproducida con fines experimentales en el Colegio de Postgraduados Campus Veracruz.

#### 3.2.1. Mantenimiento de la Cría de *D. citri*

Para la cría de *D. citri* en invernadero se realizaron las siguientes actividades:

- Se podaron 30 plantas certificadas de lima Persa, establecidas en invernadero, posteriormente se selló cada corte con pintura de aceite (Apéndice A 1. Inciso a y b).
- Se fertilizaron con Triple 17 y Osmocote y se regaron las plantas cada tercer día y se controlaron plagas (Apéndice A 1. Inciso c y d).

- Las plantas con brotes tiernos se agruparon dentro de jaulas armadas con tubos de PVC cubierta de tela organdi la cual permite una óptima aireación (Apéndice A 2).
- Posteriormente se capturaron 500 insectos adultos de *D. citri* de la jaula de cría vieja (Apéndice A 3), y se liberaron en una jaula nueva sobre plantas con brotes tiernos, para su reproducción y así obtener adultos jóvenes para realizar bioensayos a esta colonia se le denominó “Colonia Campus Veracruz”.
- Las colectas se realizaron durante los meses mes de julio y diciembre de 2017.
- Se monitoreó la cría diariamente para conocer los diferentes estados además de llevar un registro de cada etapa del insecto, de este modo tener lista la cría adulta del insecto, para la realización de los bioensayos, finalmente los datos se anotaron en el formato (Apéndice A 4).

En campo, una vez asignado el lugar por los Comités Técnicos estatales para el manejo de *D. citri* de la zona. Se localizaron las coordenadas de la parcela con ayuda del GPS (Apéndice A 5 Y 6). y se procedió a coleccionar adultos de este insecto en parcelas del municipio de Cuitláhuac, Veracruz ver croquis (Apéndice A 8)

- Se registraron los datos generales de la huerta citrícola: estado, localidad, municipio, especie cultivada, No. ARCOs, insecticida utilizado anteriormente en la parcela, la última fecha de aplicación,

la dosis utilizada y el grupo toxicológico al que pertenece, hora de la colecta de los insectos adultos de *D. citri*, de la parcela correspondiente en el formato de “Bioensayo de aplicación tópica de insecticidas con adultos de *Diaphorina citri* Kuwayama” (Apéndice A 7)

- Se colectaron insectos en los tubos Eppendorf (Apéndice A 9 inciso a); para el testigo (T) un tubo con 20 insectos al igual que en la repetición (R), sin embargo, para la R se colectan 2 tubos con 10 insectos en cada uno, para facilitar la aplicación uniforme de los aceites al momento de realizar los bioensayos en el laboratorio. En total se utilizan 120 insectos por cada dosis.
- Después de la colecta, los tubos Eppendorf se colocaron en un lugar fresco, seco y con buena aireación, para evitar la muerte de los insectos (Apéndice A 9. inciso b).
- Se cortaron hojas tiernas del cultivo con la finalidad de utilizarlos como medio natural del insecto en los bioensayos.
- Se trasladó la muestra al laboratorio de Sanidad Vegetal-Entomología del Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz para la realización de los bioensayos correspondientes.
- Esta colecta se realizó durante el mes de octubre y noviembre de 2017.

### 3.2.2. Bioensayos

Los bioensayos con insecticidas de contacto en grado técnico se realizaron con el método tópico descrito por Tiwari *et al.* (2011).

**3.2.2.1. Preparación del aditamento para el bioensayo.** En una estufa eléctrica se colocó un vaso de precipitado de 500 ml, con 200 ml de agua y 4 g de agar; se utilizó el agitador magnético durante 5 minutos a una temperatura de 300 °C, para incorporar el agua y el agar (Apéndice A 10, inciso a). Posteriormente se utilizaron cajas Petri para mantener a los insectos vivos hasta la lectura de la mortalidad; pueden ser cajas de Petri tamaño de 4 cm, previamente lavadas con agua y jabón, desinfectadas con alcohol; Se vertió el agar hasta la mitad de las cajas, se dejó reposar durante 5 min para que solidificara (Apéndice A 10, inciso b).

Después, se lavaron las hojas tiernas de lima Persa, se les retiró la humedad. Se recortaron de forma circular a la medida de las cajas (Apéndice A 10, inciso c), y se colocaron dentro de las cajas de Petri con el agar previamente solidificado, dejando el envés hacia arriba (Apéndice A 10, inciso d). Se cuidó que no quedaran espacios donde los insectos adultos pudieran meterse.

Por otro lado, se preparó la jeringa en conjunto con el microaplicador, utilizando guantes de látex en ambas manos. La jeringa se limpió exteriormente con ayuda de una sanita; se usó acetona para eliminar la contaminación de insecticidas en el interior de la jeringa, para lo cual se enjuagó 20 veces (Apéndice A 11); con esto se descarta cualquier rastro de otro insecticida que pudiera alterar los resultados del bioensayo.

Para la elaboración de los bioensayos, se hicieron cinco repeticiones (R) y un testigo (T) por repetición, al que solo se le aplicó acetona. Se durmieron los insectos con CO<sub>2</sub> para facilitar la aplicación del producto, se utilizaron 120 insectos por cada dosis según las recomendaciones (Robertson et al., 1984) (Apéndice A 12, inciso a y b). Para el testigo se extrajo acetona y se dejó caer una gota en el pronoto del insecto (Apéndice A 12, inciso c). De igual forma se aplicó el insecticida en las R1, R2, R3, R4 y R5, esta acción se realizó para las distintas dosis de ambos productos. Por último, se dejaron las cajas de Petri con los insectos ya aplicados en la cámara de cría durante 24 h (Apéndice A 12, inciso d). Posteriormente se hizo la lectura, donde se anotaron los datos de mortalidad en el formato (Apéndice A 7). Los datos finales se anotaron en la hoja Probit.

**3.2.2.2. Preparación de las dosis.** En el laboratorio se prepararon las dosificaciones de Citroil (95%) y Akaroil (98.50%) para obtener diferentes concentraciones del producto con las que se determinó el rango de mortalidad de 0 y 100% de cada producto. Se prepararon 10 ml de solución para cada dosis a utilizar y se diluyeron en Acetona grado técnico (99.60%), las soluciones se guardaron en refrigeración.

Fórmula para hacer las dosis:  $C1 * V1 = C2 * V2$

$$V1 = \frac{C2 * V2}{C1}$$

Donde:

C1: concentración inicial

C2: concentración requerida

V2: volumen final o requerido

$$V1 = 0.1 \text{ aforar a } 10 \text{ ml } V1 = \frac{0.1 * 10}{0.1}$$

$$\text{Ejemplo 1: } \frac{10\% * 20 \text{ ml}}{95\%} = 2.10 \text{ ml (Citroil)} - 20 \text{ ml} = 17.89(\text{acetona})$$

En los cuadros 3 y 4 se muestra la cantidad de soluto (Insecticida) y solvente (Acetona) que se debe agregar en 10 ml, para su uso en los bioensayos.

Cuadro 3. Dosis de Citroil (95%) para su uso en Bioensayos con *D. citri*.

<b>Dosis (%)</b>	<b>Procedimiento</b>	<b>Soluto (ml)</b>	<b>Solvente (ml)</b>
0.1	$0.1\% \times 10 \text{ ml} / 10\% = 0.1 - 10 = 9.9$	0.1	9.9
1.7	$1.7\% \times 10 \text{ ml} / 10\% = 1.7 - 10 = 8.3$	1.7	8.3
3.0	$3.0\% \times 10 \text{ ml} / 10\% = 3.0 - 10 = 7$	3.0	7.0
5.5	$5.5\% \times 10 \text{ ml} / 10\% = 5.5 - 10 = 4.5$	5.5	4.5
10	$10\% \times 20 \text{ ml} / 95\% = 2.10 - 20 = 7.9$	2.1	17.9
15	$15\% \times 10 \text{ ml} / 95\% = 1.57 - 10 = 8.43$	1.57	8.43
20	$20\% \times 10 \text{ ml} / 95\% = 2.10 - 10 = 7.9$	2.1	7.9
30	$30\% \times 10 \text{ ml} / 95\% = 3.15 - 10 = 6.85$	3.15	6.85
40	$40\% \times 10 \text{ ml} / 95\% = 4.21 - 10 = 5.79$	4.21	5.79
50	$50\% \times 10 \text{ ml} / 95\% = 5.26 - 10 = 4.74$	5.26	4.74

En el Cuadro 4 se muestra la cantidad de soluto (Akaroil 98.50%), y solvente (acetona 99.60%) que se debe agregar en un vial de 10 ml.

Cuadro 4. Dosis de Akaroil (98.50%) para su uso en Bioensayos con *D. citri*.

<b>Dosis (%)</b>	<b>Procedimiento</b>	<b>Soluto (ml)</b>	<b>Solvente (ml)</b>
0.55	0.55% x 10 ml/5.5% = 0.55-10 = 9.45		
0.9	1% x 10 ml/5.5% = 1-10 = 9.0	1.64	8.36
1.5	1.7% x 10 ml/10% = 1.7-10 = 8.3	1.7	8.3
2.5	2.5% x 10 ml/10% = 2.5-10 = 7.5	2.5	7.5
4.3	4.3 3% x 10 ml/10% = 4.3-10 = 5.7	4.3	5.7
7.5	7.5% x 10 ml/10% = 7.5-10 = 2.5	7.5	2.5
10	10% x 30 ml/98.50% = 3.04-30 = 16.96	3.04	16.96
12	12% x 10 ml/98.50% = 1.21-10 = 8.78	1.21	8.78
20	20% x 10 ml/98.50% = 2.03-10 = 7.9	2.03	7.9
30	30% x 10 ml/98.50% = 3.04-10 = 6.95	3.04	6.95

**3.2.2.3. Ventana biológica.** Es el rango de dosis o concentración entre el cual se encuentra el 0% y el 100% de actividad de un insecticida aplicado a una colonia de insectos, se establece por medio de una curva dosis-mortalidad.

**3.2.2.4. Respuesta de la ventana biológica.** El máximo nivel de mortalidad aceptable para el testigo es de  $\leq 12$ . Si en el testigo se registraba una mortalidad mayor de cero, pero menor o igual al 10% en los tratamientos, se corrige con la ecuación de Abbott (1925).

$$M.C. = \frac{X - Y}{100 - Y} (100)$$

Dónde:

M.C. = mortalidad corregida (%)

X = mortalidad en el tratamiento (%)

Y = mortalidad en el testigo (%)

**3.2.2.5. Análisis Estadístico.** La Dosis Letal media ( $DL_{50}$ ) es la dosis que produce el efecto deseado en el 50% de la población de insectos.

La línea de respuesta log dosis-Probit, así como los valores de la  $DL_{50}$ , los límites de confianza al 95% y el factor de resistencia (FR), se obtiene mediante el procedimiento Probit del programa SAS 9.2 (SAS Institute Inc., 2009).

El FR sirve para comparar una población de referencia que es susceptible, con otra que se requiere monitorear por sospecha de que puede haber desarrollo de resistencia, Indica cuántas veces es más tolerante o resistente el insecto a dicha sustancia, a la  $DL_{50}$ .

Los valores del FR a 50% de mortalidad se obtienen a dividir la  $DL_{50}$  de la población de campo entre la  $DL_{50}$  de la colonia susceptible. Las respuestas de las poblaciones comparadas no se consideran significativamente diferentes cuando los límites de confianza se traslapan (Robertson y Preisler, 1992).

$$\frac{DL50 (Colonia de campo)}{DL50 (Colonia susceptible)} = FR$$

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la colonia de *D. citri* establecida en el invernadero del Campus Veracruz, la mortalidad se expresa a partir de la dosis al 1% de Citroil. La dosis de este insecticida que representa la DL<sub>50</sub> fue de 7.36% ver figura 4, es decir, para eliminar al 50% de la población se debe aplicar esta dosis, dentro de los límites de confianza de 6.12 a 8.75%. y en Akaroil colonia campus Veracruz la DL<sub>50</sub> fue de 5.29% dentro de los límites de confianza de 3.77 a 7.55% (Ver figura 5).

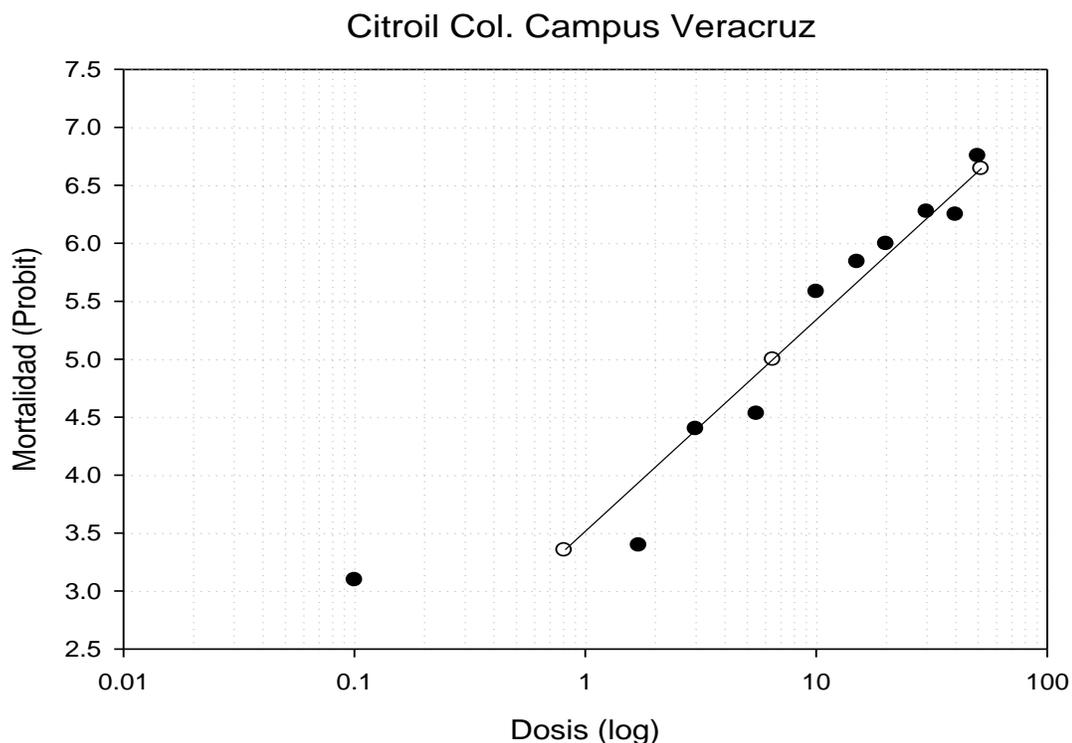


Figura 4. DL<sub>50</sub> de Citroil col. Campus Veracruz.

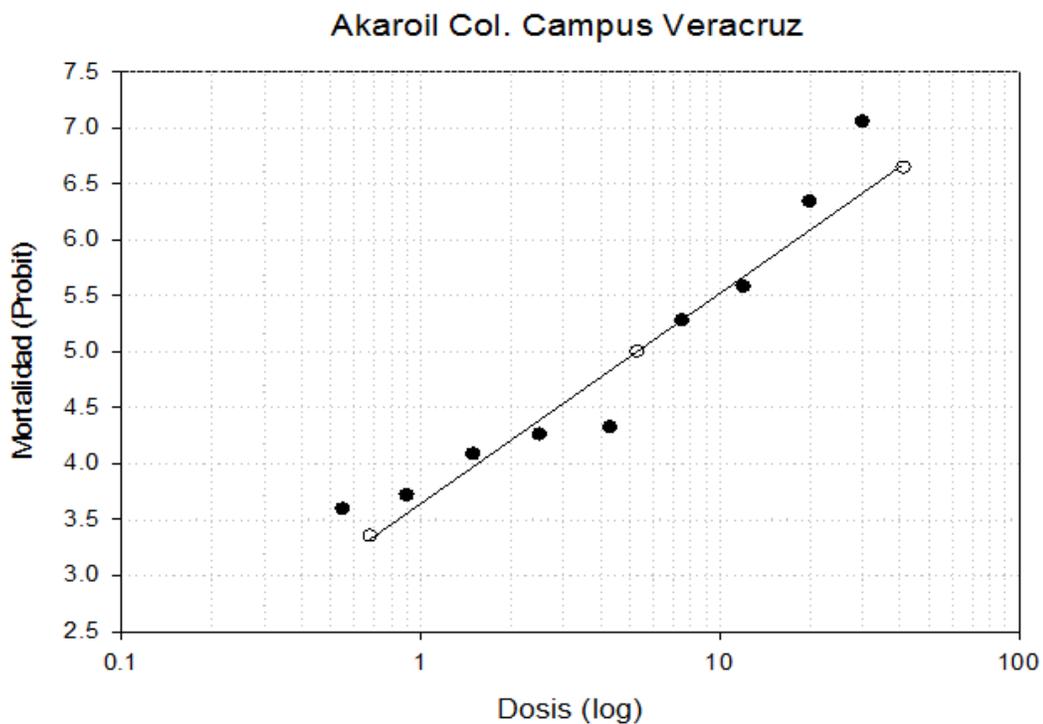


Figura 5. DL<sub>50</sub> de Akaroil col. Campus Veracruz.

En la colonia de insectos colectados en Cuitláhuac, también se expresó la mortalidad a partir de la aplicación de 1% de Citroil. La dosis que representa la DL<sub>50</sub> es de 4.03% (Ver figura 6), con los límites de confianza de 2.28 a 6.45%. En cuanto a Akaroil en la colonia Cuitláhuac la DL<sub>50</sub> fue de 12.52% con los límites de confianza de 9.95 a 16.75% (Ver figura 7).

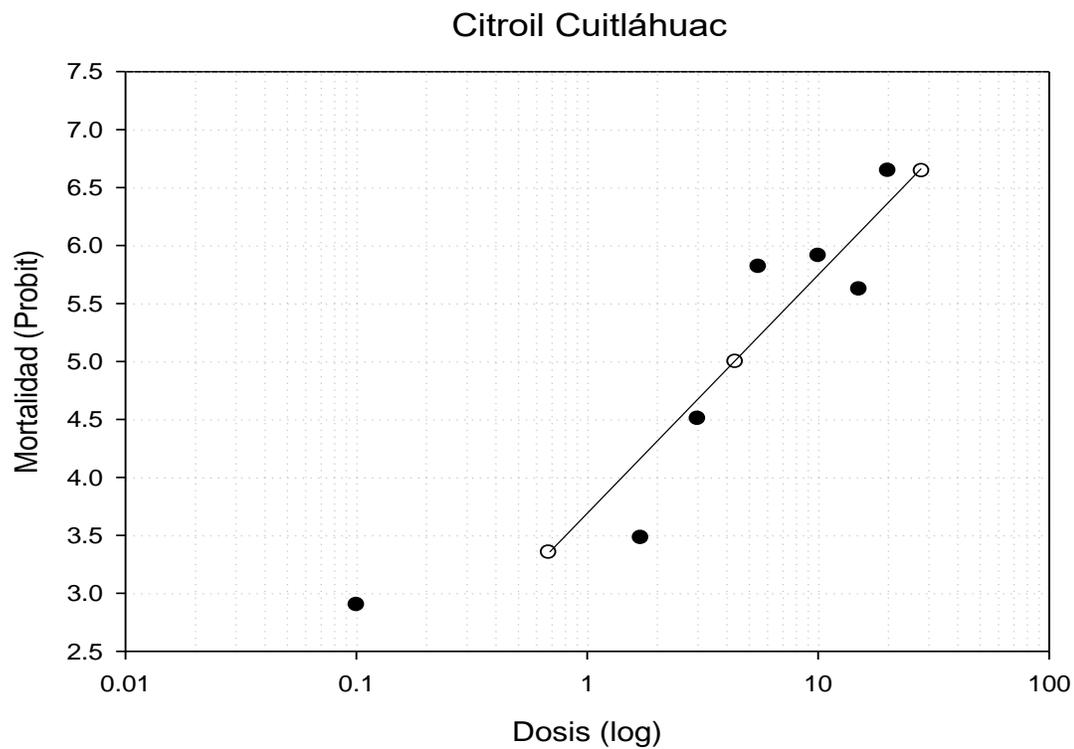


Figura 6. DL<sub>50</sub> de Citroil col. Cuitláhuac.

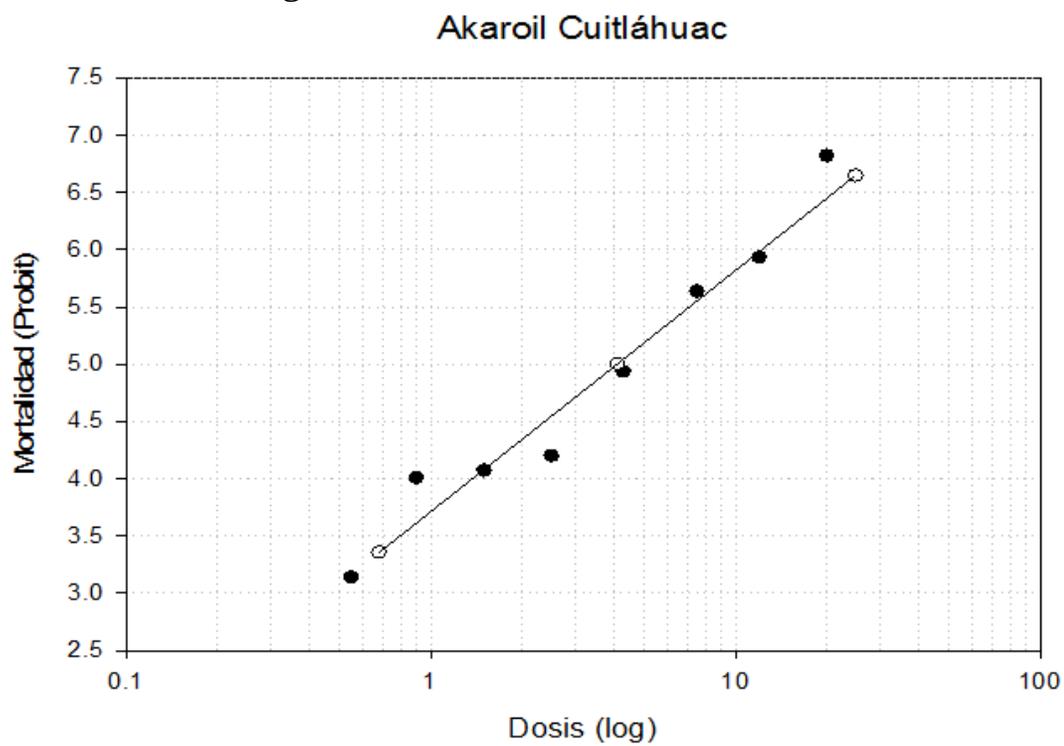


Figura 7. DL<sub>50</sub> de Akaroil col. Cuitláhuac.

Al dividir la  $DL_{50}$  de la colonia susceptible entre la  $DL_{50}$  de la colonia de campo de Cuitláhuac, el factor de resistencia fue de 0.57X. En la colonia considerada como susceptible, la  $DL_{50}$  fue más alta que la de la colonia de campo, por ello el valor es menor a uno. A pesar de la diferencia, ambos valores de  $DL_{50}$  son muy parecidos. Para considerar una colonia como susceptible, el factor de resistencia debe ser  $> 1$  respecto a la colonia de campo, es decir que siempre debe haber una colonia base y otra con mayor tolerancia/resistencia. Sin embargo, aquí la que se consideraba más susceptible obtuvo un valor más alto en la  $DL_{50}$ . Por tanto, se puede proponer la  $DL_{50}$  de campo como el valor base de susceptibilidad a este producto, lo cual se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Comparación de las  $DL_{50}$ , entre las colonias “Campus Veracruz” y la “Colonia Cuitláhuac”.  $DL_{50}$  = Dosis letal 50 (ng IA insecto<sup>-1</sup>). LF = límite fiducial o confianza al 95%. FR = Factor de Resistencia.

<b>Insecticida</b>	<b>Población</b>	<b><math>DL_{50}</math></b>	<b>FR</b>	<b>LF</b>
<b>CITROIL</b>	Campus-Veracruz	7.25%	0.55X	6.44320-8.13640
	Cuitláhuac	4.03%		2.28370-645652
<b>AKAROIL</b>	Campus-Veracruz	5.29%	2.36X	3.77634-7.55520
	Cuitláhuac	12.52%		9.95642-16.75349

#### 4.1. COMPARACIÓN DE CITROIL CON AKAROIL

Se llevó a cabo un análisis del comportamiento de la mortalidad de *D. citri* ante Citroil y Akaroil con la finalidad de obtener resultados y observar diferencias entre los dos insecticidas.

Se presenta la comparación de la respuesta de la aplicación de Citroil y Akaroil a insectos adultos colectados en ambas colonias (Figura 8). Cabe aclarar que la formulación de estos dos aceites minerales es bastante diferente como se muestra en las fichas técnicas (Ver sección 2.5.2).

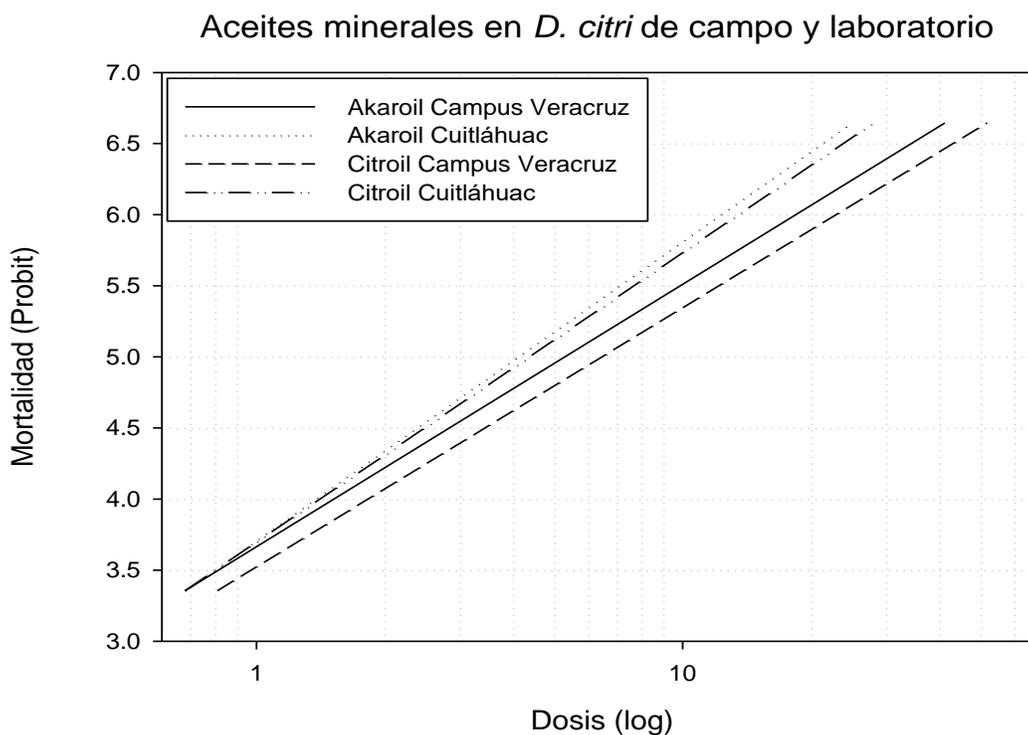


Figura 8. Susceptibilidad de adultos de *D. citri* a Citroil y Akaroil.

Conforme al análisis realizado, no se observó ningún valor que denotara resistencia de los insectos a los productos evaluados. Sin embargo, está claro que los insectos tienden a desarrollar habilidades genéticas que los hacen capaces de sobrevivir a dosis comerciales. Los hallazgos concuerdan con las fichas técnicas donde no se recomienda el producto contra adultos del insecto plaga. Sin embargo, era necesario hacer esta evaluación para corroborar lo antes mencionado.

#### 4.1.2. Análisis cromatográfico de Citroil y Akaroil.

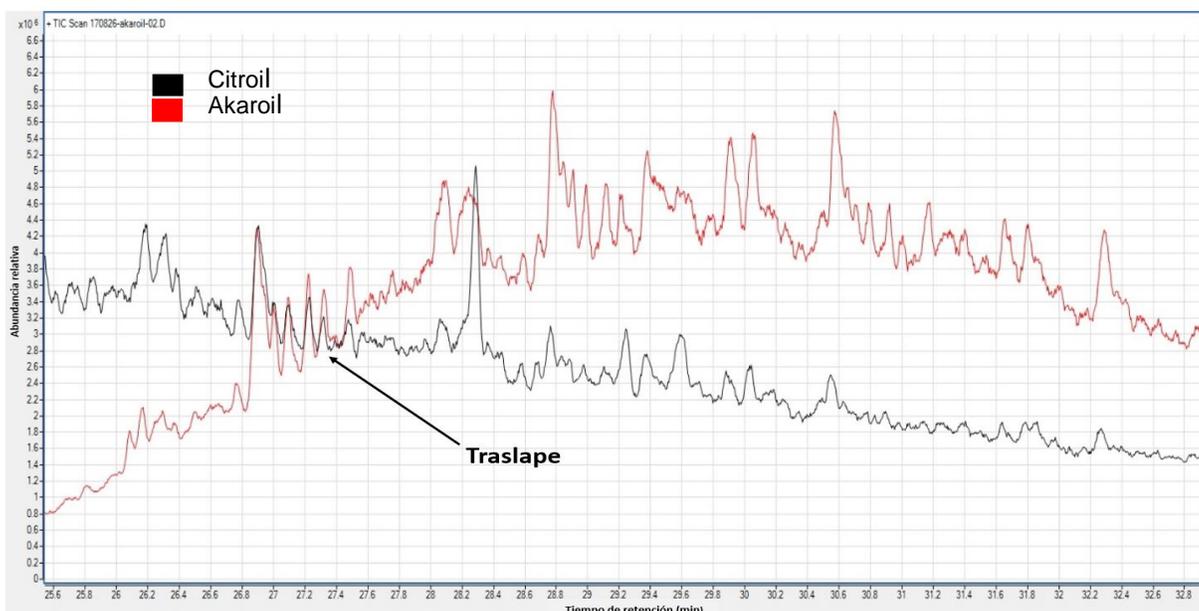


Figura 9. Región del traslape de Citroil y Akaroil en el cromatograma.  
Fuente: Cromatografía realizada por el Dr. Fredy Morales Trejo.

Citroil y Akaroil a pesar de que ambos pertenecen al mismo grupo toxicológico, al ser analizados mediante cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (Apéndice 12), columna HP-5MS; inyección mediante Headspace. Volumen de inyección 1  $\mu$ L; split 5:1; velocidad de

Helio: 0.6 mL/min. Temperatura inicial 80°C durante 2 minutos, incrementando hasta 250°C a 5°C/min, manteniéndose durante 3 minutos finales, dieron como resultado ser dos sustancias con compuestos muy diferentes rojo y negro, y en alguna región donde salieron al mismo tiempo comparten el mismo compuesto tal vez en alguna concentración menor o mayor.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se realizaron las siguientes conclusiones.

### 5.1. CONCLUSIÓN

Se comprobó, que las crías de *D. citri* de invernadero responden igual a las de campo, a pesar de estar en condiciones diferentes, lo cual demuestra que el mantenimiento del COLPOS es adecuado para seguir utilizando la cría, para futuras investigaciones.

Los aceites minerales Citroil y Akaroil no son adecuados como insecticidas para el control de adultos de *D. citri*. Las diferencias en susceptibilidad o resistencia entre colonias de insectos de campo e invernadero no son tan amplias, como para ser responsables de la reducción en mortalidad del insecto.

Se determinó mediante un bioensayo tóxico las dosis de citroil y akaroil que eliminan el 50% de la población de adultos del insecto vector. La  $DL_{50}$  de las colonias de Citroil col. Campus Veracruz es de 7.25% y col. Cuitláhuac es de 4.03% en cuanto a Akaroil la  $DL_{50}$  de la col. Campus Veracruz es de 5.29 y para la col. Cuitláhuac es de 12.52%.

## 5.2. RECOMENDACIONES

Se recomienda hacer una selección adecuada de insecticidas para el control de *D. citri*, con base en los estudios de resistencia y de efectividad biológica, puede hacer más eficiente la aplicación de los productos, disminuir las dosis de aplicación y costos de adquisición.

Debido a que la resistencia a insecticidas es un fenómeno dinámico y de baja susceptibilidad. Es importante dar continuidad a este estudio y hacer la evaluación de los aceites minerales, principalmente en ninfas de *D. citri*, lo cual no fue evaluado en este trabajo.

## 6. LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *Economic Entomology*, 18: 265-267.
- Alemán, J., H. Baños & J. Ravelo. 2007. *Diaphorina citri* y la Enfermedad Huanglongbing: una combinación destructiva para la producción citrícola. *Revista Protección Vegetal*. La Habana. 2224-4697 pp.
- Boina, D. R., E. O. Onagbola, M. A. Salyani, & L. L. Stelinski. 2009. Antifeedant and sublethal effects of imidacloprid on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Pest Manage. Sci.* 65: 870-877.
- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, Newly Emerging, century-old disease of citrus. *Plant Pathology* 88: 7-37.
- Bové, J.M. 2012. Huanglongbing and the future of citrus in Sao Paulo. *Plant Pathology* 94: 465-467.
- Brown, A. W. A., & K. Pal. 1971. Insecticide resistance in arthropods. In *World Health Organization Monograph Series N° 38*. Geneva, World Health Organization. 491 p.
- CABI/EPPO. 2001. *Diaphorina citri*. *Distribution Maps of Plant Pests*, Map. No. 334. CAB INTERNATIONAL. Wallingford, UK: Disponible en: <https://gd.eppo.int/taxon/DIAACI/distribution>.
- Capoor, S. P., G. Rao D., and M. Viswanath S. 1974. Greening disease of citrus in the Deccan Trap Country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: Cohen M (ed). *Proceedings of the 6th Conference of the International Citrus Virology*, University of California. India. 43-49 pp

- Catling H., D. 1970. Distribution of the psyllid vectors of citrus greening disease, with notes on the biology and bionomics of *Diaphorina citri*. FAO Plant Protection Bulletin. 8 p.
- Da Graca J., V. 1991. Citrus greening disease. Annu. Rev. Phytopathol. 29:109-136.
- Darderes, C. S. G. 2009. *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae), vector de la bacteria que causa el Huanglongbing (HLB-Greening (Online). Disponible en: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Citricos/Documentos/004%20%20Documentos%20Competitividad%20Cadena/004%20%20D.C.%20%20Vector%20de%20la%20Bacteria%20que%20Causa%20el%20HLB.pdf> (verificado 15 septiembre 2017).
- Díaz-Zorrilla, U., H. Cabrera-Mireles, J. A. Villanueva-Jiménez, F. D. Murillo-Cuevas, & J. I. López-Arroyo. 2011. Selección de insecticidas y épocas de aplicación para el control del psílido asiático en limón Persa en Veracruz. Folleto Técnico 6. INIFAP, México 16 p.
- Dirección General de Sanidad Vegetal y Sistemas de Alerta Fitosanitaria de la NAPPO 2008. (Online). Disponible en: <http://jlmc-entomologo.blogspot.mx/2010/04/diaphorina-citri-kuwayama.html> (Verificado 30 septiembre 2017).
- FAOSTAT. 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations (Online). Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/007/y5143s/y5143s00.pdf> (Verificado 10 octubre 2017).
- García-Méndez, V. H., L. D. Ortega-Arenas, J. A. Villanueva-Jiménez, & H. Sánchez-Arroyo. 2016. Susceptibilidad de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) a insecticidas en Veracruz, México. Agrociencia 50: 355-365.
- Georghiou, G. P., & C. E. Taylor. 1986. Factors influencing the evolution of resistance. In: Committee on Strategies for the Management of Pesticide Resistant Pest Populations, National Research Council

(eds). Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management. National Academic Press, Washington, D.C. 157-169 pp.

- Gottwald, T., R. da Graça J., & R. Bassanezi B. 2007. Citrus Huanglongbing: the pathogen and its impact. Plant Health Progress .doi:10.1094/PHP-2007-0906-01-RV. Disponible en: <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/HuanglongbingImpact.aspx> (28 de agosto de 2017)
- Halbert, S. E., & L. Manjunath K. 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.
- Lewis-Rosenblum, H., X. Martini S. Tiwari, & L. L. Stelinski. 2015. Seasonal movement patterns and long-range dispersal of Asian citrus psyllid in Florida citrus. Journal of Economic Entomology. 108: 1-8.
- López JI, A. Peña M., A. Rocha M., & Loera J. 2005. Ocurrencia en México del psílido asiático *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae). In: Memorias del VII Congreso Internacional de Fitopatología. Chihuahua, México. 68 p.
- López-Arroyo, J.I., M. A. Rocha Peña, & J. Loera. 2005. Ocurrencia en México del psílido asiático *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae). In: Memorias del VII Congreso Internacional de Fitopatología. Chihuahua, Chi., Méx. 68 p.
- López-Arroyo, J. I., T. De León, M. Ramírez, & C. Loera J. 2008. Especies de Chrysoperla (Neuroptera: Chrysopidae) presentes en México. In: M. D. Salas y E. Salazar (Eds.). Entomófagos en el control de plagas agrícolas en México. Universidad Autónoma de Guanajuato. Guanajuato, México. 69-80 pp.
- Martínez-Carillo, J.L. 2008. Ficha Técnica *Diaphorina citri* Kuwuyama, Psílido asiático de los cítricos. SAGARPA, SENASICA, SINAVEF 18.p.

- Martínez-Carrillo, J.L. y Cortez Mondaca. 2008. El psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* amenaza la producción citrícola de México. *In: Memoria del XI Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas*. UABC.
- SAGARPA. 2009. Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-047-FITO-2009. Diario Oficial. Primera sección. (Online). [http://pflanzengesundheit.jki.bund.de/dokumente/upload/74020\\_mx3-nom-047-2009\\_citrus-candidatus-liberibacter-kons.pdf](http://pflanzengesundheit.jki.bund.de/dokumente/upload/74020_mx3-nom-047-2009_citrus-candidatus-liberibacter-kons.pdf) (Verificado el 03 de noviembre 2017)
- Normes OEPP, EPPO. 2005. Standards, Diagnostics, Organisation Européenne et méditerranéenne pour la Protection des Plantes, 1, rue Le Nutre, 75016 Paris, France, OEPP/EPPO Bulletin 35: 271-273.
- OEPP/EPPO. 1988. Data sheets on quarantine organisms No. 151, Citrus greening bacterium and its vectors *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae*. Bulletin OEPP/EPPO. 18: 497-507.
- Ortiz, R. A., M. Fuel S., M. Mejía, L., M. Guarín J., & E. Arévalo Peñaranda 2014. Biología de *Diaphorina citri* Kuwayama. En Identificación de la dinámica poblacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en los cultivos de cítricos de Colombia: una herramienta para implementar un sistema piloto de seguimiento de poblaciones del insecto vector del HLB. *Zootaxa*. 8-18 pp.
- COSAVE.Pdf. Ficha técnica *Diaphorina citri* Kuwayama [www.cosave.org/sites/default/.../Ficha%20Técnica%20de%20Diaphorina%20citri.pdf](http://www.cosave.org/sites/default/.../Ficha%20Técnica%20de%20Diaphorina%20citri.pdf).
- Robertson, J. L., & H. K. Preisler. 1992. Pesticide Bioassays with Arthropods. CRC Press, Boca Raton, Florida. 127 p.
- Robertson, J. L., K. C. Smith, N.E.Savin, & R. L. Lavigne. 1984. Effects of Dose Selection and simple Size on the Precision of Lethal Dose Estimates in Dose-Mortality Regression. *J. Economic Entomology*. 77: 833-837.

- SEFIPLAN. Sistema de información municipal, cuadernillos municipales 2015. (Online).  
<http://www.veracruz.gob.mx/finanzas/files/2015/05/Cuitl%C3%A1huac.pdf>
- SAS. Statistical Analysis System. 2009. SAS/STAT® 9.2 User's Guide. Second Edition. SAS Institute, Cary, NC, USA. 7886 p.
- SENASICA. 2012. Situación actual y perspectiva del huanglongbing y psílido asiático de los cítricos en México. (Online)  
<http://www.senasica.gob.mx> (Verificado el 07 de julio de 2017)
- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2014. (Online). Situación Actual y Perspectivas del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos en México.  
<http://www.senasica.gob.mx>. (Verificado el 07 de julio de 2017).
- SIAP. 2012. Producción agrícola por cultivo y por estado. México (Online).  
[http://www.siap.gob.mx/idex.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=350](http://www.siap.gob.mx/idex.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350) (verificado el 08 de agosto de 2017).
- Tiwari, S., K. Pelz-Stelinski, & L. Stelinski. 2010. Effects of *Candidatus Liberibacter*, conventional, alternative products and application times. (ed.) INIFAP, México. 35 p.
- Tiwari, S., R. S. Mann, M. E. Rogers, & L. L. Stelinski. 2011. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. *Pest Manage. Sci.* 67: 1258-1268.
- Tiwari, S., L. L. Stelinski, & M. E. Rogers. 2012. Biochemical basis of organophosphate and carbamate resistance in Asian citrus psyllid. *Journal Economic Entomology* 105: 540-548.
- Tiwari, S., B. Liu, R. S. Mann, N. Killiny, & L. L. Stelinski. 2015. Effects of cold-acclimation, pathogen infection, and varying temperatures on insecticide susceptibility, feeding, and detoxifying enzyme levels in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Florida Entomol.* 98: 870-879.

- Torres-Pacheco, I., J. López-Arroyo, J. A. Aguirre-Gómez, R. G. Guevara-González, R. Yáñez-López, M. I. Hernández-Zul, & J. A. Quijano-Carranza. 2013. Potential distribution in México of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) vector of Huanglongbing pathogen. *Florida Entomologist* 96: 36-47.
- Vargas, J. M. 2013. Método analítico. Determinación mediante caracteres morfológicos de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en Colombia (Online). [http://www.bdigital.unal.edu.co/53469/1/Yenmy\\_Josue\\_Ramos\\_Delgado](http://www.bdigital.unal.edu.co/53469/1/Yenmy_Josue_Ramos_Delgado). Pdf (Verificado 23 septiembre de 2017).
- Villanueva-Jiménez, J. A., H. Cabrera-Mireles. R. José-Pablo, L. Aguilar-Román, F. D. Murillo-Cuevas, & U. Díaz-Zorrilla. 2010. Evaluación preliminar de plaguicidas selectivos a enemigos naturales de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), en toronja de la zona central costera de Veracruz. Memorias del 1er Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. INIFAP. Monterrey, Nuevo León, México. 471-478 pp.
- Wooler A., Padgham D., & Arafat A. 1974. Outbreaks and new records. Saudi Arabia. *Diaphorina citri* on citrus. *FAO Plant Protection Bulletin* 22: 93-94.
- Yang, C. T. 1984. Psyllidae of Taiwan. Special Publication, Taiwan Museum. 3: 37-41.

**APÉNDICE**

Figura A 1. (a) Poda. (b) Sellamiento de plantas con pintura. (c) Fertilización. (d) Riego.



Figura A 2. Preparación de las jaulas para la cría de *D. citri*.



Figura A 3. Colecta de 500 adultos de la cría vieja para infestar jaulas nuevas.

	<b>Fertilización/dosis/planta</b>			<b>Fecha de presencia de yemas:</b>				
<b>Fecha de poda:</b>	<b>Osmocote:</b>	<b>Triple 17 NPK:</b>		<b>Fecha de liberación de <i>D. citri</i>:</b>				
<b>No. de individuos liberados:</b>	<b>Hora de liberación:</b>			<b>Periodo de infestación de brotes:</b>				
<b>No. de individuos retirados:</b>	<b>Hora de retiro:</b>			<b>Temperatura:</b>	<b>Humedad relativa:</b>			
<b>Fecha</b>	<b>Estado</b>							<b>Observaciones</b>
	<b>Huevo</b>	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>N3</b>	<b>N4</b>	<b>N5</b>	<b>Adulto</b>	

Figura A 4. Formato “Cría de *Diaphorina citri* para realizar las pruebas de susceptibilidad con adultos en laboratorio, 2017”



Figura A 5. Registro de los datos de la parcela en el formato tomando en cuenta las indicaciones del comité de la zona.



Figura A 6. Registro de las coordenadas de la parcela con el GPS.

“Bioensayo de aplicación tópica de insecticidas con adultos de *Diaphorina citri* Kuwayama”.

Estado: _____ Municipio: _____ Localidad: _____ No. ARCO: _____	Especie cultivada: _____ _____ Fecha de la última aplicación regional e insecticida aplicado: _____ _____ _____														
<table border="1" style="margin: auto; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="text-align: center;">F e c h a</td></tr> <tr><td style="height: 20px;"> </td></tr> <tr><td style="text-align: center;">Número de insectos muertos</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">R e p e t i c i ó n</td></tr> </table>												F e c h a		Número de insectos muertos	R e p e t i c i ó n
F e c h a															
Número de insectos muertos															
R e p e t i c i ó n															
Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Muertos (total)	Mortalidad (%)	Notas		
Coordenadas: _____															

Figura A 7. Formato exclusivo para bioensayos con dosis discriminante.



Figura A 8. Croquis de las parcelas de los ARCOs.



Figura A 9. Colectas de *D. citri*, (a) Tubo Eppendorf, (b) Tubos depositados en una hielera con bolsas de gel a temperatura ambiente.

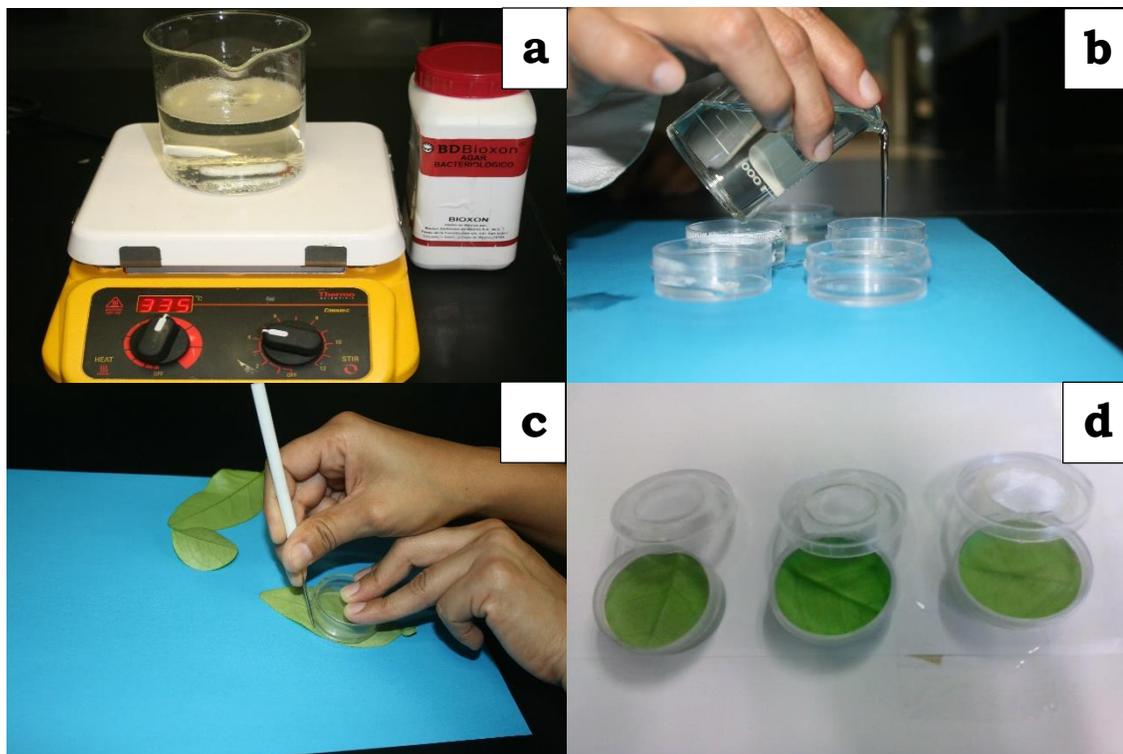


Figura A 10. Preparación del aditamento para el bioensayo. (a) vaso de precipitado con Agar y agua, sobre una estufa a 300°, (b) llenado de las cajas de Petri. (c) corte de las hojas con una aguja entomológica. (d) colocación correcta de las hojas dentro de las cajas de Petri.



Figura A 11. Limpieza de la microjeringa.

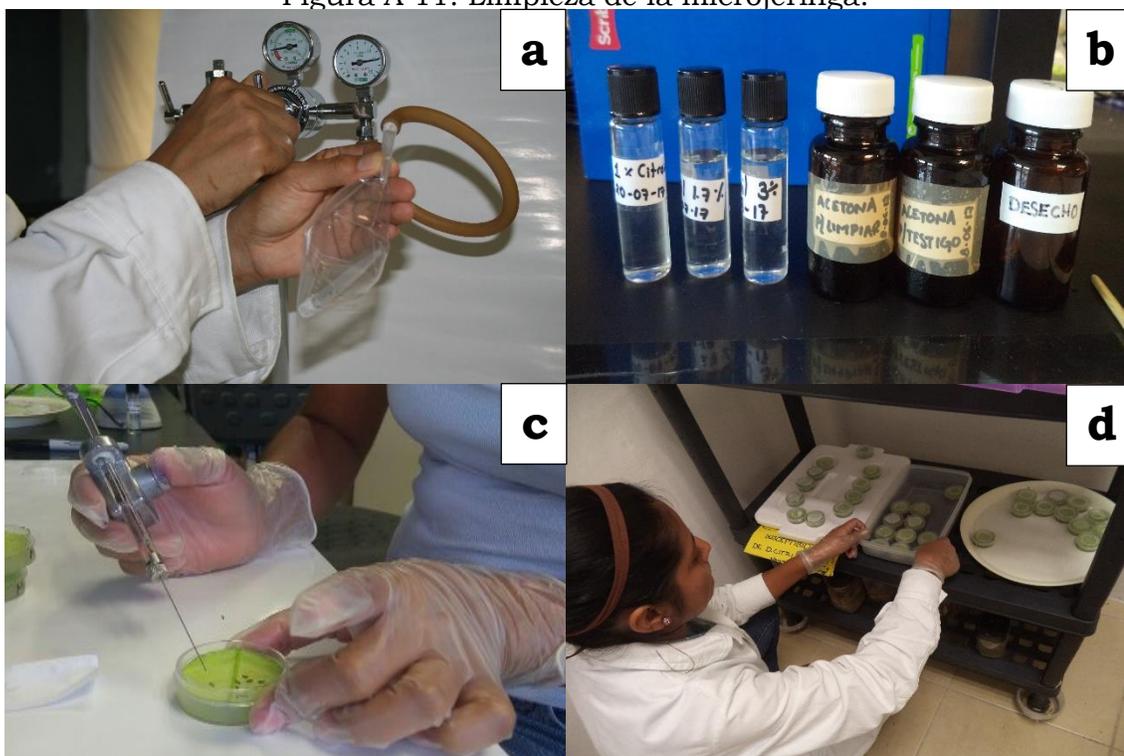


Figura A 12. Procedimiento del bioensayo tópico. (a) aplicación de CO<sub>2</sub> para dormir adultos de *D. citri*. (b) viales con insecticida a diferentes porcentaje y acetonas utilizadas para el bioensayo. (c) aplicación del producto en el pronoto del insecto con apoyo de la microjeringa, acoplada al microaplicador. (d) colocación del bioensayo terminado en la cámara de cría durante 24 h.



Figura A 13. Espectrómetro de masas.