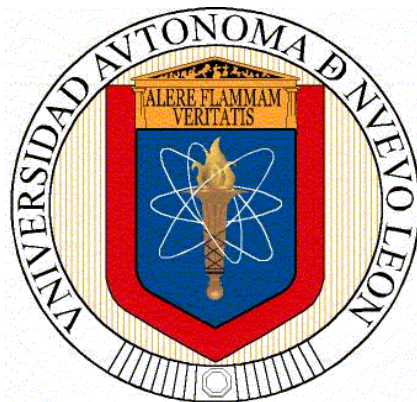


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA EL CONTROL DE
DIAPHORINA CITRI VECTOR DE LA BACTERIA *CANDIDATUS*
LIBERIBACTER ASIATICUS, AGENTE CAUSAL DEL
HUANGLONGBING**

PRESENTA

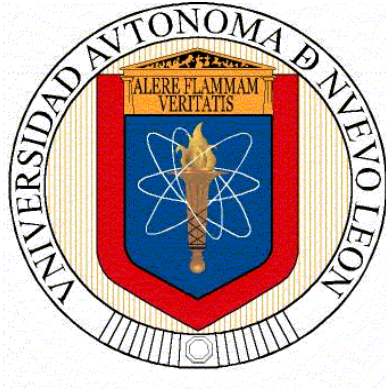
NORMA PATRICIA CÁZARES ALONSO

**COMO REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS
NATURALES**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.

MAYO 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA EL CONTROL DE *Diaphorina citri*
VECTOR DE LA BACTERIA *Candidatus Liberibacter asiaticus*, AGENTE
CAUSAL DEL HUANGLONGBING

PRESENTA

NORMA PATRICIA CÁZARES ALONSO

COMO REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS
CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARIA JULIA VERDE STAR

DIRECTOR EXTERNO: DR. ISIDRO HUMBERTO ALMEYDA LEÓN

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.

MAYO 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA EL CONTROL DE *Diaphorina citri*
VECTOR DE LA BACTERIA *Candidatus Liberibacter asiaticus*, AGENTE CAUSAL DEL
HUANGLONGBING

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

PRESENTA

NORMA PATRICIA CÁZARES ALONSO

COMITÉ DE TESIS

DIRECTORES DE TESIS

Presidente *Maria Julia Verde Star*
DRA. MARÍA JULIA VERDE STAR

Secretario *Isidro Humberto Almeyda León*
DR. ISIDRO HUMBERTO ALMEYDA LEÓN

Vocal *Azucena Granday Cárdenas*
Dra. Azucena Granday Cárdenas

Vocal *Catalina Rivas Morales*
Dra. Catalina Rivas Morales

Vocal *María Adriana Núñez Gonzales*
Dra. María Adriana Núñez Gonzales

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
INDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE TABLAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Importancia del cultivo de los cítricos	5
2.2. Descripción taxonómica <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)	5
2.2.1. Biología y características morfológicas	6
2.3. Daños e Importancia Económica de <i>Diaphorina citri</i>	8
2.4. Importancia de <i>Candidatus Liberibacter</i> spp.	10
2.5. Métodos para el control del vector <i>Diaphorina citri</i>	13
2.6. Alternativas naturales para el control de <i>D. citri</i>	14
2.7 Métodos de detección de la bacteria <i>Candidatus Liberibacter</i> spp.	18
2.8 Relaciones genéticas	19
3. JUSTIFICACION	22
4. HIPOTESIS	23
5. OBJETIVO GENERAL	23
5.1. Objetivos particulares	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1. Detección de <i>Candidatus Liberibacter</i> spp.	25
6.1.1.Extracción de ADN en cítricos	25
6.1.2.Extracción de ADN en psílicos	26
6.1.3.Reacción en cadena de la polimerasa	26
6.2. Obtención de extractos etanólicos	27
6.2.1. Evaluación extractos etanólicos contra <i>D. citri</i>	28
6.3.Análisis genético de <i>D. citri</i>	30
7. RESULTADOS	32
7.1 Extracción de ADN de la bacteria <i>C. Liberibacter</i> y psílico <i>D. citri</i>	32
7.2. Detección de la bacteria <i>C. Liberibacter</i> spp.	33
7.3 Evaluación de los extractos etanólicos	34
7.4. Análisis genético del psílico <i>D. citri</i> .	42
8. DISCUSIÓN	46
9. CONCLUSIONES	52
10.LITERATURA CONSULTADA	53

DEDICATORIA

La presente Tesis está dedicada a ti mi Dios por darme la oportunidad de vivir, regalarme una familia maravillosa y apoyarme en las adversidades y tiempos difíciles.

A mis padres

Sr. Fernando Cázares Orta y Sra. Juana Alonso de Cázares †.

Por darme la vida, por su amor, apoyo, paciencia y comprensión, por enseñarme a crecer, por los regañones y desacuerdos y por estar a mi lado en todos los momentos, a mi madre que aunque falta físicamente sé que me cuida y acompaña desde donde se encuentre, a mi padre por sus consejos y compañía, les dedico mi trabajo como signo del respeto y del cariño que les profeso, muchas gracias.

A mis hermanos

Ana Luisa, Fernando y Ricardo, mis sobrinas Arely, Dayanna y Fernanda.

Por su apoyo y cariño incondicional, porque me han brindado los momentos más alegres y felices de mi vida.

A toda mi familia

Con mucho respeto y cariño por todos los momentos alegres y tristes que hemos compartido, por su apoyo y lealtad, gracias.

AGRADECIMIENTOS

Mi eterna gratitud a DIOS por permitirme vivir y darme la oportunidad de emprender y ver terminado el presente trabajo.

Dra. María Julia Verde Star. Por brindarme su confianza, apoyo, paciencia, comprensión, su generosa amistad y por su valiosa cooperación en el desarrollo de este proyecto.

Dr. Isidro Humberto Almeyda León. Por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por su amistad, su paciencia y confianza, ya que sin su asesoramiento y valiosa aportación de conocimientos no hubiera llegado a concluir este escrito.

Dr. José Isabel López Arroyo Por permitirme realizar esta investigación, formando parte del proyecto No. 129491461: Manejo de la enfermedad Huanglongbing (HLB) mediante el control de poblaciones del vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae), el psílido asiático de los cítricos; así como por su apoyo material y técnico.

Dra. Azucena Oranday Cárdenas, Dra. Catalina Rivas Morales y Dra. María Adriana Núñez Gonzales. Por su valiosa cooperación en la revisión y supervisión del desarrollo de este proyecto.

Al Campo Experimental General Terán del Centro regional de Investigación Regional Noreste perteneciente al **Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias**, a la **Facultad de Ciencias Biológicas y Preparatoria 15** de la **Universidad Autónoma de Nuevo León**, por todas las facilidades otorgadas y por permitirme realizar este trabajo y poder obtener el grado de Doctor en Ciencias

A todas las instituciones les reitero mi reconocimiento y agradecimiento por haberme facilitado los materiales, reactivos e insumos empleados en la investigación, pues sin ellos no se habría llegado a la meta final.

A mis amigos, compañeros por brindarme su amistad, confianza, apoyo y su valiosa ayuda, a lo largo de esta etapa y a todas aquellas personas que de alguna u otra manera contribuyeron al logro de mis objetivos

MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
01	Psilido asiatico <i>Diaphorina citri</i>	7
02	Zona afectada en México por el psilido <i>Diaphorina citri</i> (SENASICA, 2010).	9
03	Daños provocados en cítricos por <i>D. citri</i>	10
04	Daños causados por <i>C. Liberibacter</i>	11
05	Zona afectada en México por la bacteria <i>Candidatus liberibacter</i> (SENASICA, 2013)	12
06	Muestra de la calidad de ADN extraído de las muestras procesadas	33
07	ADN extraído de psilido <i>D. citri</i>	34
08	Detección de la región del operon β ribosomal de <i>C.Liberibacter</i>	35
09	Valores promedios de insectos presentes en las plantas tratadas con diferentes especies de plantas y dosis a la 24 y 48h después de la aplicación.	37
10	Agrupación de tratamientos por medio de la prueba de Tukey para rango estudentizado - HSD a las 24h después de la aplicación.	38
11	Agrupación de tratamientos por medio de la prueba de Tukey para rango estudentizado - HSD a 48h dda	40
12	Valores promedios de psilidos muertos a las 48h dda, tratados con diferentes dosis y especies de plantas	41
13	Agrupación de tratamientos en mortandad por medio de la prueba de Tukey para rango estudentizado (prueba HSD) a 48h dda	42
14	Fragmentos amplificados de la región COII de <i>D. citri</i> .	43
15	Fragmentos amplificados de la región mitocondrial ARNr 16S de <i>D. citri</i>	44
16	Dendograma de distancias genéticas de Nei por el método de agrupamiento UPGMA inferido de un fragmento del gen mitocondrial ARNr 16S para poblaciones de <i>Diaphorina citri</i> .	45
17	Dendograma de distancias genéticas de Nei por el método de agrupamiento UPGMA inferido de un fragmento del gen mitocondrial COII para poblaciones de <i>Diaphorina citri</i> .	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
1	Lista de las muestras procesadas en la detección del HLB.	24
2	Iniciadores utilizados para amplificar regiones específicas de la bacteria causante del HLB	27
3	Especies y concentraciones evaluadas contra el psilido <i>D. citri</i>	30
4	Valores promedios de psilidos presentes a las 24 y 48h dda en plantas de cítricos tratadas con extractos de diferentes especies de plantas y dosis evaluadas.	36
5	Análisis de varianza sobre la repelencia de insectos a las 24h después de la aplicación.	37
6	Análisis de varianza sobre la repelencia de insectos a las 48h de exposición a los tratamientos	39
7	Valores promedios de mortalidad de psilidos a las 48h dda tratados con extractos de diferentes dosis y especies de plantas.	40
8	Análisis de varianza sobre la mortalidad de los psilidos a las 48h de exposición a los tratamientos	41

LISTA DE ABREVIATURAS

Agua miliQ	Agua ultra pura
CTAB	Cetil trimetil amonio bromide
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTP's	Desoxinucleotidos trifosfatados
EDTA	Etilendiaminotetraacetato disódico
et al.,	y colaboradores
etc.	Etcétera
g	Gramos
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Mili molar
MPM	Marcador de peso molecular
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de hidrogeno
p/v	Peso/volumen
rpm	Revoluciones por minuto
seg	segundo
TBE	Solución Amortiguadora Tris Borato-EDTA
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UPGMA	Agrupamiento de Unidades de Distancias Mínimas y Promedios Aritméticos
vol	Volumen
µl	microlitros
µM	micromolar
°C	Grados centígrados
%	Porcentaje

RESUMEN

Se evaluaron extractos crudos etanólicos de neem *Azadirachta indica* (Juss), orégano *Lippia graveolens* (Kunth), guayaba *Psidium guajava* (L.), mandarina cleopatra *Citrus reshni* (Hort ex Tan) y ajo *Allium sativum*(L.), contra el psílido *D. citri* en dosis de 50 y 500ppm. Además el orégano fue evaluado como aceite esencial al 2 y 4% utilizando Tween 20 como emulsificante. Para determinar la eficiencia de los tratamientos como repelentes contra el psílido, se contabilizaron los insectos vivos encontrados sobre la planta a las 24 y 48h. Para determinar su eficiencia como insecticidas se contabilizaron los insectos muertos a las 48h después de la aplicación. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el paquete estadístico SAS® System, con el procedimiento ANOVA y las medias obtenidas fueron comparadas mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Se determinó que el mejor tratamiento de repelencia a las 24h y 48 h después de la aplicación fue el extracto de ajo a 50 ppm, con valores de 84.37% y 87.50% respectivamente. El mejor tratamiento para mortalidad fue el aceite de orégano al 4% con un porcentaje de mortalidad de 70.31%. Con la finalidad de establecer las relaciones genéticas de poblaciones de *D. citri* colectadas en diferentes regiones del país, se amplificaron fragmentos de los genes mitocondriales ARNr 16S y Citocromo oxidasa 2, lográndose establecer que al menos existen dos haplotipos en las poblaciones de estudio. También se realizó el análisis molecular de 354 muestras de plantas y de *Diaphorina citri* para la detección de *Ca. Liberibacter* spp, detectándose solamente 2 muestras positivas. Los resultados obtenidos, permiten inferir el uso del extracto de ajo y del orégano en el manejo integrado de *Diaphorina citri* a nivel de campo, lo que sin duda reducirá el uso de pesticidas para el control del psílido que es el vector de la bacteria causante del Huanglongbing. También se podría establecer la búsqueda de enemigos naturales de *Diaphorina citri* con una mayor eficiencia de control basándose en el origen de las poblaciones del insecto para su integración exitosa a un programa de control biológico.

ABSTRACT

Ethanollic crude extracts neem *Azadirachta indica* (Juss) , oregano *Lippia graveolens* (Kunth) , guava *Psidium guajava* (L.) , Cleopatra mandarin *Citrus reshni* (Hort ex Tan) and garlic *Allium sativum* (L.) against psyllid *D. citri*. were evaluated at doses of 50 and 500ppm. Besides oregano was evaluated as an essential oil at 2 and 4 % using Tween 20 as emulsifier. To determine the efficiency of the treatments as repellents against psyllid, live insects found on the plant at 24 and 48 h were recorded. To determine its efficiency as insecticides dead insects at 48h after application were recorded. The data obtained were analyzed using the statistical package SAS ® System, the ANOVA procedure and the means obtained were compared by the Tukey test ($P \leq 0.05$). It was determined that the best repellent treatment at 24h and 48 h after application garlic extract was 50 ppm , with values of 84.37 % and 87.50 % respectively . The best treatment for mortality was oregano oil 4% with a percentage of 70.31 % of dead insects. In order to establish the genetic relationships of populations of *D. citri* collected in different regions, fragments of mitochondrial genes 16S r RNA and cytochrome oxidase 2 was established that there are at least two haplotypes in the study populations were amplified. Molecular analysis of 354 samples of plants and *Diaphorina citri* for the detection of *Ca. Liberibacter* spp was also performed, only 2 positive specimens detected. The obtained results allow to infer the use of the extract of garlic and oregano in the integrated management of *Diaphorina citri* field level, which will certainly reduce the use of pesticides to control psyllid is the vector of the bacterium that causes Huanglongbing. You could also set the search for natural enemies of *Diaphorina citri* with greater control efficiency based on the origin of insect populations for a successful biological control program integration.

1. INTRODUCCIÓN

La citricultura representa una de las mayores actividades agrícolas en la República Mexicana que cuenta con 560 mil hectáreas plantadas, distribuidas en 27 estados. La naranja representa el 62% de la superficie sembrada con aproximadamente 345 mil hectáreas, el limón representa el 28% con 153 mil hectáreas, en el 10% restante se encuentran los cultivos de mandarina, toronja, lima, etc. Con una producción de aproximadamente 7 millones de toneladas de fruta y una derrama económica de 13 mil millones de pesos SIAP, 2013, esta actividad agrícola es un importante recurso para el país, generando aproximadamente 70 mil empleos directos y 250 mil indirectos SAGARPA, 2009.

La citricultura tanto en nuestro país como a nivel mundial se ha visto amenazada por la afluencia de enfermedades emergentes y limitantes que ocasionan serios daños en la producción.

La enfermedad conocida como el dragón amarillo de los cítricos o Huanglongbing (HLB), ha provocado efectos devastadores en la citricultura de todos los países productores de cítricos donde está ó ha estado presente.

Esta enfermedad ha afectado gravemente la producción de cítricos, se estima que 60 millones de árboles fueron destruidos a nivel global, Das *et al.*, 2007 afectando gravemente la economía de países como Asia, Brasil, Estados Unidos y África, donde se han alcanzado pérdidas de 100% en cosechas Alemán y Ravelo 2007, Bassanezi *et al* 200.

El agente causal del HLB es una bacteria gram positiva, restringida a floema y existen tres especies que son: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter africanus* y *Candidatus Liberibacter americanus*. El HLB afecta a especies de la familia de las Rutáceas y prácticamente a todas las especies de

cítricos cultivados en el mundo, provocando desde una baja producción y deformación del fruto hasta la muerte del árbol. La especie asiática y americana tienen como vector al psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*, Kuwayama, (Hemiptera: Liviidae), el cual adquiere y disemina la bacteria al alimentarse de árboles infectados y sanos. Además, causa daños directos como plaga a las plantas, ya que se alimenta en los brotes tiernos, ocasionando su muerte y reduciendo significativamente la producción. Da Graca, 1991.

El estudio de la dinámica poblacional y estructura genética de las poblaciones del insecto plaga hace posible predecir los incrementos y decrementos en el tamaño poblacional así como tener un mayor conocimiento de las migraciones entre las poblaciones Roderick, 1996, puede generar conocimiento y tecnología para integrar el manejo de las poblaciones, así como desarrollar estrategias para prevenir y contrarrestar el daño provocado o el que en un futuro pueda llegar a provocar el HLB en la citricultura del país. La caracterización molecular de las poblaciones de *D. citri*, colectadas en diferentes regiones del país, son de ayuda relevante para establecer su origen y procedencia, y pueden ser la base para generar herramientas útiles en el manejo del HLB. En los estudios de biología molecular donde esté involucrada la amplificación de alguna secuencia del genoma de algún individuo, es necesario contar con métodos de extracción del DNA eficientes, económicos, de fácil manejo y ahorro de tiempo.

En el presente estudio se evaluaron algunas estrategias biotecnológicas orientadas al control del vector *Diaphorina citri*, así como estudios de relaciones genéticas entre las poblaciones de diferentes regiones cítricas del país. También se realizó la detección y caracterización molecular del agente causal de la enfermedad y de esta manera contribuir a la sustentabilidad de la producción cítrica en México

2 ANTECEDENTES

2.1 Importancia del cultivo de los cítricos

La producción cítrica mundial se encuentra distribuida principalmente en cinco países: Brasil, Estados Unidos de Norteamérica, China, México y España, donde se encuentran establecidas alrededor de siete millones de hectáreas de cítricos, de las cuales el 57% corresponden a naranja, 39% a limón, lima y mandarina y 4% a toronja. La región cítrica de nuestro país destaca en la comercialización mundial de naranja con un tercer lugar y un primer lugar en limón mexicano y limas; con aproximadamente 560,000 hectáreas plantadas, lo cual representa la actividad frutícola de mayor importancia socioeconómica para el país FAOSTAT, 2004. Esta actividad se ve amenazada por al menos 74 especies de artrópodos perjudiciales, de los cuales 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. Sin embargo, la principal amenaza actual de la industria cítrica es la presencia de *Diaphorina citri*, insecto que causa daños directos al cultivo cuando se encuentra presente en altas densidades poblacionales; pero sobre todo porque es el vector de la bacteria *C. Liberibacter spp.*, causante del Huanglongbing (HLB), considerada la peor enfermedad de los cítricos Capoor *et al.*, 1974; Da Graca 1991.

2.2. Descripción taxonómica *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)

Reino: Animalia

Phillum: Invertebrata

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Familia: Psyllidae

Género: *Diaphorina*

Especie: *D. citri*

Nombre científico: *Diaphorina citri*

Nombre común: psilido asiático de los cítricos, chicharrita

2.2.1. Biología y características morfológicas

El psilido asiático de los cítricos presenta un ciclo de vida corto y alta capacidad de reproducción especialmente en área costeras calurosas Catling, 1970. El ciclo de vida consta de las etapas de huevo, cinco instares ninfales y adultos, la duración del ciclo biológico (huevo-adulto) varía de 14.1 a 49.3 d., a 28°C y 15°C, respectivamente, siendo las temperaturas de 25° a 28°C las más adecuadas para su desarrollo, los huevos eclosionan entre 4.1 y 4.3 días y sus cinco instares pueden tener una duración de 12.6 a 13.5 días de acuerdo al hospedero que utilice Tsai *et al.*, 2002. Los huevos son amarillo brillante, de forma ovoide, alargados, con prolongación en una de las puntas, miden aproximadamente 0.30 mm de longitud y 0.14 mm de ancho, son colocados generalmente en el extremo de los brotes tiernos.

Las ninfas son aplanadas dorsoventralmente, de color anaranjado-amarillo, sin manchas abdominales, con esbozos alares, un par de ojos rojos compuestos y dos antenas de color negro; presentan filamentos a lo largo del abdomen. Tienen 5 estadios ninfales: el 1er estadio miden 0.30 mm de longitud y 0.17 mm de ancho; el 2do estadio miden 0.45 mm de longitud y 0.25 de ancho; el 3er estadio miden 0.74 mm de longitud y 0.43 de ancho; el 4to estadio miden 1.01 mm de longitud y 0.70 mm de ancho; el ultimo estadio (5to) miden 1.60 mm de longitud y 1.02 mm de ancho, se alimentan en hojas y tallos tiernos, formando colonias con un número variable de individuos.



Figura 1. Adulto del psilido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*

El adulto mostrado en la figura 1, presenta un cuerpo de color marrón moteado (pardo amarillento), recubierto de polvo ceroso; ojos rojos; cabeza marrón claro; primer par de alas más ancho en el extremo, con áreas color oscuro. Las antenas presentan el ápice negro con dos manchas marrón claro en la parte media. Los machos son levemente más pequeños que las hembras y con la punta del abdomen roma, mientras que el abdomen de la hembra termina en una punta bien marcada. Los adultos pueden medir entre 3-4 mm, el tamaño promedio de las hembras es 3.3 mm de largo y 1 mm de ancho, en tanto que el de los machos es 2.7 mm de largo y 0.8 mm de ancho. Generalmente, cuando se están alimentando se encuentran en posición inclinada con la parte posterior del cuerpo hacia arriba, lo que los hace fácilmente reconocibles. Los adultos tienen poca capacidad para sostener vuelos muy largos, pueden ser transportados a grandes distancias por las corrientes de aire, son saltadores activos, al alimentarse de las hojas o brotes característicamente guardan un ángulo de 30° respecto a la superficie de la hoja. El incremento de la población está estrechamente relacionado con el aumento de brotes de los hospederos. Quereshi y Stansly 2008.

La reproducción del insecto está determinada por la atracción inicial del hospedante, su capacidad de ovopositar y de sobrevivir hasta la emergencia del adulto Hodkinson 2009.

Múltiples factores bióticos y abióticos están involucrados en las interacciones que determinan el desarrollo y establecimiento de *D. citri* en la región; la temperatura, humedad relativa, hospedante, enemigos naturales y labores agrícolas afectan la densidad poblacional Aurambout *et. al.*, 2009.

El insecto es muy persistente y sobrevive a una amplia gama de temperaturas extremas desde 45°C en climas áridos hasta los -7°C en zonas húmedas subtropicales Aubert y Hua 1990. El rango de temperatura entre 25°C y 28°C son óptimas para el desarrollo y la longevidad del psilido, las temperatura frías suprimen la ovoposición y prolongan el desarrollo de las ninfas Fung y Chen, 2006. La precipitación afecta negativamente al crecimiento poblacional debido al comportamiento de ovoposición que se lleva a cabo en los brotes superiores de las plantas por lo que son afectados directamente Sohail, *et al.*, 2004.

2.3. Daños e Importancia Económica de *Diaphorina citri*

El psilido asiático fue descrito por primera vez en Taiwán en 1907 Halbert y Manjunath 2004, actualmente es un insecto plaga con categoría cuarentenaria OEPP/EPPO, 1988 y es de particular importancia porque está establecido ampliamente en las zonas citrícolas del mundo CABI/EPPO, 2001.

El primer informe sobre la presencia del psilido asiático *Diaphorina citri* Kuwayama en México fue realizado por Dr. D.B.Thomas (USDA-ARS) al encontrar al insecto en los cítricos del estado de Campeche en marzo 2002, en el año 2003 *D. citri* fue registrada simultáneamente en los estados de Nuevo León y Tamaulipas. Para el año 2004, la plaga se había extendido hasta los estados de Colima, Querétaro, San Luís Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán. Durante 2005 el insecto también fue encontrado en el estado de Sinaloa y posteriormente 2006 en los estados de Michoacán, Oaxaca, Sinaloa y Sonora, para prácticamente completar la invasión de las zonas citrícolas del país, López

et al., 2005. En la figura 2 se muestra la zona afectada en México por el psilido hasta el 2010. SENASICA, 2010.



Figura 2. Zona invadida en México por el psilido *Diaphorina citri* (SENASICA, 2010).

El rango de huéspedes de *D. citri* evidentemente está restringido a cítricos y especies cercanas de la familia Rutaceae, dentro de los cítricos destacan el limón, lima, toronja y la planta ornamental *Muralla paniculada* CABI/EPPO, 2001, al alimentarse en una planta infectada adquiere el patógeno en 30 min, los adultos y las ninfas de cuatro y quinto instar son capaces de transmitir el patógeno después de 8-12d después de haberlo adquirido Roistacher 1991.

D. citri causa daño a la planta provocando defoliación y muerte en las ramas, causa daños severos en los brotes de crecimiento de las plantas, reducción en el tamaño de la fruta, desarrollo asimétrico, aborto de la semilla y falta de jugo (Figura 3). Infestaciones altas de este insecto también originan abundantes secreciones de mielecilla que favorece la presencia y desarrollo del hongo de la fumagina, la cual afecta el vigor de los árboles al interferir en el proceso de la fotosíntesis Halbert y Manjunath et al., 2004.



Fig. 3 Daños provocados en cítricos por *D. citri*

D. citri en infestaciones fuertes puede matar los brotes vegetativos en desarrollo o causar la abscisión de hojas Michaud, 2004. Además de los daños directos que este insecto causa, representa también una grave amenaza para la industria citrícola en general, debido a que es vector de la bacteria restringida al floema *Ca. Liberibacter* spp., causante del “huanglongbing” o dragón amarillo de los cítricos que es una enfermedad devastadora Da Graca y Korsten 2004.

2.4. Importancia de *Candidatus Liberibacter* spp.

El Huanglongbing (HLB), es una de las enfermedades más graves que afectan a la citricultura mundial, Halbert, 1999. Es una α -protobacteria *Candidatus Liberibacter* con 3 formas: *Ca. L. asiaticus* para Asia y América, *Ca. L. africanus*

para África Da Graca, 1991 y *Ca. L. americanus* para América, Texeira *et al.*, 2005, esta bacteria circula por el floema de la planta.

Los síntomas iniciales de la enfermedad se muestran en la figura 4, generalmente aparecen en una rama o gajo, que se destaca por el color amarillo que contrasta con el color verde de las hojas de las ramas no afectadas, también es común la ocurrencia de síntomas semejantes a la deficiencia del zinc, calcio y nitrógeno en las hojas de las ramas infectadas, las cuales presentan coloración amarillo pálido, con áreas de color verde, irregulares. En algunos casos se observa el engrosamiento y aclaración de las nervaduras de las hojas, las cuales quedan con un aspecto corchoso. Cuando la enfermedad evoluciona, ocurre una inmensa defoliación de las ramas afectadas y los síntomas inician a aparecer en otras ramas de la planta, hasta aparecer en toda la copa, inclusive las puntas se secan o mueren Da Graca y Korsten 2004. El fruto queda deformado y asimétrico, mediante un corte en sentido longitudinal del fruto afectado es posible verificar internamente filetes anaranjados que parten de la inserción con la región del pedúnculo. El fruto puede presentar internamente diferencia de maduración en las diferentes partes, en la cáscara puede aparecer pequeñas manchas circulares verde-claras que contrastan con el verde normal del fruto Da Graca, 1991.



Fig. 4. Daños causados por *Ca. Liberibacter*

Se transmite por yemas infectadas y por insectos vectores principalmente por el psilido asiático de los cítricos (*D. citri*) el cual se considera su vector más eficiente Garnier y Bové 2000.

Hasta el momento no existe variedad de copa o portinjerto de cítrico resistente a la enfermedad, hasta el año 2004 el Huanglongbing se encontraba restringido a los continentes asiático y africano, sin embargo en noviembre 2004, Brasil informó oficialmente la aparición de la enfermedad y su difusión en forma rápida, en agosto del 2005 la enfermedad fue detectada en los Estados Unidos de América Knighten *et al.*, 2005. En el 2007 es reportada en Cuba Da Graca 2008. En México se detectó por primera vez en Yucatán en el 2009 y en el 2010 en Nayarit y Jalisco SENASICA, 2010, el mapa de infestación en la República Mexicana se muestra en la figura 5., Los estados son: Yucatán, Sinaloa, Quintana Roo, Nayarit, Campeche, Colima, Michoacán, Chiapas, Hidalgo, Baja California Sur, Tabasco y Guerrero. En Veracruz, Morelos, Sonora, Nuevo León, Puebla y San Luis Potosí se han encontrado psilidos infectados sin tener nuevos reportes. SENASICA 2013

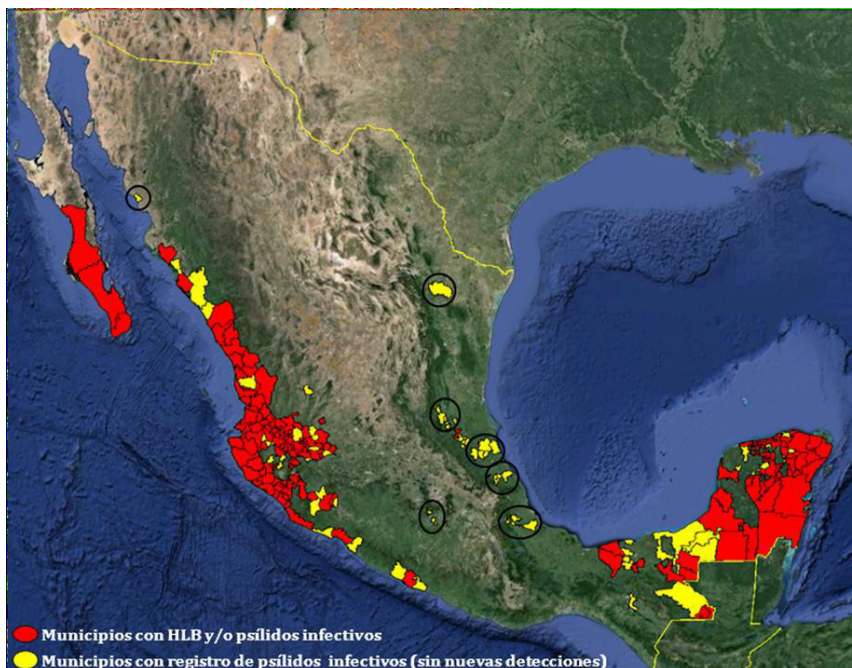


Fig. 5. Zona afectada en México por la bacteria *Candidatus liberibacter* (SENASICA, 2013)

2.5. Métodos para el control del vector *Diaphorina citri*

En el mundo se han empleado diversos métodos y estrategias encaminadas a enfrentar la destrucción provocada por el vector y la bacteria, estos métodos incluyen la destrucción y eliminación de fuentes de inóculo, el control del vector y la renovación de plantas. Chiou, 1998.

Diaphorina citri puede ser controlado eficientemente con productos químicos, ofrecidos en el mercado, se recomienda insecticidas sistémicos solo en plantas jóvenes y en plantas en producción insecticidas de contacto, con la desventaja de ser altamente contaminante para el medio ambiente y a largo plazo trae como consecuencia la aparición de plagas secundarias al tener que efectuar varias aplicaciones por año Mead, 1977. El insecticida sistémico Confidor 200 g/L SL (cuyo ingrediente activo es imidacloprid), ha sido uno de los más empleados recientemente, puede acarrear problemas en el agro ecosistema cítrícola, por su elevada toxicidad sobre organismos utilizados en el control biológico Llorens 2007.

En el caso del control biológico *D. citri*, puede ser controlado utilizando enemigos naturales donde se destaca el parasitoides *Tamarixia radiata*. El éxito de un programa de control biológico requiere de muchas investigaciones para la determinación del ecotipo así como de su potencial, además del establecimiento de la población antes de utilizarlo como bioregulador Mc Farland y Hoy 2001.

2.6. Alternativas naturales para el control de *D. citri*

Para el control y manejo de poblaciones de *D. citri* se han utilizado diversos métodos como el control químico, biológico y medidas preventivas López *et al.*, 2004. En el caso del control químico, ya se encuentran en el mercado algunos productos eficientes para el control del psilido, pero con la desventaja de ser altamente tóxicos contra organismos utilizados en el control biológico y son altamente contaminantes al ambiente, ocasionando en el mediano y largo plazo la aparición de plagas secundarias y resistentes a los insecticidas utilizados Llorens 2007.

La alternativa de usar productos naturales o sus derivados como bioplaguicidas es brindar protección al cultivo, como son biodegradables no representan riesgos para el ambiente o la salud humana y/o animal. Actualmente muchos productos naturales presentan un gran potencial en su uso como controladores de plaga Fuentes 2000.

Existen reportes de diversos extractos de plantas con efectividad en el control de plagas tales como el neem *Azadirachta indica*,(Juss), árbol originario de la India y Birmania, pertenece a la familia Meliaceae, vive en regiones tropicales y subtropicales, presenta numerosos principios activos terpénicos y la azadirachtina que producen efectos anti alimentarios, retrasos en el crecimiento, reducción de fecundidad, provocan trastornos en la muda, defectos morfológicos y cambios en el comportamiento Banchio *et al.* 2003. Se ha

determinado que la azadirachtina funciona como disuasivo o supresor de la ovoposición (Salas 2001), y es eficiente contra un gran número de especies como *Oebalus poecilus* chinche plaga del cultivo de arroz Sutherland *et al.* 2002. En extracto metanólico la azadirachtina evita la ovoposición y puesta de huevos de *Erias vitella*, plaga del algodón (Gajmer *et al.* 2002. El extracto etanólico de los frutos del neem, es efectivo contra el mosquito del dengue *Aedes aegypti* Wandscheer *et al.* 2004. La azadirachtina se encuentra en formulaciones de bioplaguicidas específicos evaluados contra *Saccharosydne saccharivora* vector del amarillamiento de la hoja de caña de azúcar con efecto antialimentario Giraldo *et al.* 2006.

Las propiedades del neem están basadas en el parecido de sus componentes con las hormonas reales, de tal forma que los cuerpos de los insectos lo absorben fácilmente bloqueando su sistema endocrino y afectando su comportamiento de diferentes maneras: Destruyendo e inhibiendo el desarrollo de huevos, larvas o crisálidas, así como su apareamiento y comunicación sexual, bloqueando la habilidad para tragar (reduciendo la movilidad intestinal), inhibiendo la formación de quitina (material del que se compone el esqueleto del insecto), etc. Capataz *et al.*, 2007.

Otras características destacables del neem son: difícil desarrollo de resistencia por tratarse de una mezcla de componentes bioactivos, sistémico a través de las raíces cuando se aplican al suelo, elevada biodegradabilidad, sobre todo por la acción de la radiación U.V., con una persistencia en campo de 4-8 d. y posibilidad de sinergismo con otros productos naturales como *Bacillus thurigiensis* Ramos *et al.*, 2004.

También se ha comprobado la efectividad del ajo *Allium sativum* (L.) planta bulbosa, cultivada como hortaliza que pertenece a la familia Amaryllidaceae, utilizado en la cocina como condimento a nivel mundial, en la eliminación y control de plagas como escarabajos del frijol mexicano, langostas, chapulines,

gusanos del tabaco, cucarachas, minadores de hoja, plagas de algodón, café y arroz, entre otros Cortez 2007. Se han reportado preparaciones etanólicas de ajo que repelen completamente a *Planococcus citri* cochinilla harinosa de los cítricos Aguirre y Delgado 2010 Los compuestos disulfúricos y trisulfúricos, así como el aceite esencial del ajo presentan efecto inhibitorio de *D. citri* sin afectar a los enemigos naturales Mann *et al.* 2011.

Se han evaluado dosis de 500 y 750 cc/ha, de extracto de ajo en la reducción de las poblaciones de la mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae), en siembra experimental de tomate, *Lycopersicon esculentum*, destacándose como un disuasivo o supresor de la ovoposición Salas, 2001.

El orégano *Lippia graveolens* (Kunth), es de origen mexicano, presenta uso ancestral como planta medicinal, pertenece a la familia Verberaceae, sus componentes químicos principales son el timol y carvacrol, que presentan actividades antioxidantes y antimicrobianas. El extracto crudo del orégano fue efectivo en mortalidad de todos los estadios larvales, huevo y adulto del acaro *Eotetranychus lewisi* plaga del durazno Quintos *et al.* 2005. En diferentes especies de orégano se ha verificado su eficiencia considerando que poseen un amplio espectro. Los extractos de las especies *Origanum compactum* y *Origanum mejorana* son tóxicos para adultos de la mosca de Hesse (Cecidomyiidae) plaga de trigo en marruecos Lamiri *et al.* 2001.

El aceite de orégano (*Origanum syriacum*) en una concentración de 36mg/L presenta poder insecticida en el cuarto estadio larval del mosquito *Culex pipens* Traboulsi *et al.* 2002. El aceite del orégano (*Lippia graveolens*), se ha probado con gran éxito en técnicas de repelencia y letalidad de *Varroa destructor* Pérez *et al.* 2008. Es igualmente efectivo que los insecticidas sintéticos para combatir plagas como el escarabajo común (*Rhizopertha dominica*) en cereales almacenados Khalfi *et al.* 2008.

La guayaba *Psidium guajava* (L.), es un árbol de zonas tropicales y subtropicales de América perteneciente a la familia Myrtaceae, posee glándulas secretoras de aceite esencial rico en taninos y flavonoides derivados de quercetina, fruto rico en vitamina C. Se han realizado estudios de intercalada entre la plantación de cítricos demostró ser una buena alternativa para el control de *D. citri* Ichinose *et al.*, 2008, y su aceite esencial puede ser más eficiente para suprimir a *D. citri* ACIAR, 2008. Posteriormente se demostró que el aceite esencial de la guayaba presenta repelencia en orugas de *Spodoptera frugiperda* Lima *et al.*, 2009. En estudios sobre compuestos volátiles en hoja de guayaba el dimetil disulfuro (DMDS) es el responsable del efecto protector contra *D. citri*, y solo se produce cuando la hoja sufre daños mecánicos, tiene un efecto de 10 min Rouseff *et al.*, 2008. El DMDS ejerce neurotoxicidad insecticida a través de la disfunción mitocondrial y activación de los canales K-ATP y es tóxico en mamíferos Dugravoit *et al.*, 2003.

Mandarina cleopatra *Citrus reshni* (Hort ex Tan), es un árbol cítrico de la familia Rutaceae, sus componentes químicos primordiales son limoneno, citronelal, terpenos, carvacrol, etc., es utilizada como portainjerto de distintas especies cultivadas de cítricos como naranja, pomelo y limonero se considera resistente a los suelos calizos, tolerante a enfermedades como la tristeza de los cítricos, exocortis, psoriasis y cachexia Amorós 2003. Es un portainjerto que induce crecimiento lento, buena productividad y calidad del fruto Soler y Soler 2006. En bioensayos comparados con otros cítricos al ataque de *D. citri* en diferentes estadios la mandarina cleopatra ocasiona una disminución significativa en la supervivencia, el desarrollo y la ovoposición del insecto Tsagkarakis y Rogers 2010. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de diferentes especies vegetales como repelentes e insecticidas contra el vector del HLB el psílido de los cítricos *Diaphorina citri*.

2.7 Métodos de detección de la bacteria *Candidatus Liberibacter spp.*

La detección temprana y eliminación de los árboles enfermos es vital para evitar la propagación de la bacteria. Existen una variedad de pruebas o métodos para la detección de la bacteria como los ensayos biológicos donde se utilizan plantas indicadoras Roistacher, 1991, con el inconveniente de ser laboriosos, costosos, con necesidad de un periodo largo de tiempo, además de que el material puede presentar infecciones mixtas. Métodos indirectos basados en la distribución anormal del almidón en plantas con HLB utilizando yodo como marcador, está siendo utilizado actualmente combinando con la microscopia Etxeberria *et al.*, 2007. Sin embargo, la acumulación de almidón también se puede deber a factores como deficiencia de microelementos como el zinc Li, *et al.*, 2003.

En el caso de los métodos serológicos se ha logrado la obtención de varios anticuerpos monoclonales específicos utilizando cepas asiáticas y africanas Gao *et al.*, 1993, pero son ineficientes porque no reaccionan con todos los aislamientos en diferentes zonas geográficas, determinando que existen siete serotipos distintos y variación genómica entre los aislamientos de *Ca. Liberibacter spp.* Garnier *et al.*, 1991.

El perfil de metabolitos que produce una planta sana a una enferma es diferente por lo que se puede utilizar la herramienta para la identificación de una enfermedad Kell *et al.*, 2005. Basados en estas técnicas se han utilizado la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y la resonancia magnética (NMR) para identificar algunos biomarcadores de tensión en la planta Glauser *et al.*, 2008, los cuales deberán estar plenamente identificados para la bacteria.

Las técnicas moleculares, han demostrado su competitividad en el diagnóstico de múltiples enfermedades, con las ventajas de poder elegir la región de ADN específica para el estudio, se cuenta con una gran cantidad de marcadores

moleculares, además de requerir muy poca cantidad de muestra. Los principales métodos de diagnóstico de HLB están basados en la técnica de PCR amplificando fragmentos derivados de diversas partes del genoma bacteriano, por ejemplo se han desarrollado iniciadores OI1 y OI2c que permiten la amplificación de las cepas asiáticas y africana de la región 16S del ADN ribosomal de la bacteria con una amplificación de un fragmento de 1160pb, los iniciadores OA1 y OI2c, se utilizan para amplificar la cepa africana, para la diferenciación entre las dos especies se lleva a cabo la digestión del producto de amplificación con la endonucleasa Xba1, obteniendo tres fragmentos de restricción para la especie africana de aproximadamente 520pb, 506pb y 130pb, para la especie asiática se producen dos fragmentos de restricción de aproximadamente 640pb y 520pb Jagoueix *et al.*, 1996. A partir de las secuencias del operón rplKJAL-rpoBC se diseñaron los iniciadores rplA2 y rplJ5 los cuales permiten distinguir las dos cepas sin necesidad de usar alguna endonucleasa ya que se amplifican fragmentos de diferente pares de bases de acuerdo a la cepa amplificada, para cepa asiática se amplifica un fragmento 703pb y uno de 669pb para la cepa africana. Hocquellet *et al.*, 1999. La detección de la cepa *Ca. Liberibacter americanus* se realiza utilizando los iniciadores GB1 y GB3, diseñados a partir de la secuencia de la región 16S del ADN ribosomal, su producto de amplificación es de aproximadamente 1027pb Texeira *et al.*, 2005.

2.8 Relaciones genéticas

El estudio de la dinámica poblacional y estructura genética de las poblaciones del insecto plaga hace posible predecir los incrementos y decrementos en el tamaño poblacional así como tener un mayor conocimiento de las migraciones entre las poblaciones (Roderick, 1996). El análisis molecular permite obtener la filogenia con el propósito de determinar especies, variaciones intra e inter específicas en el ADN De Rojas, *et al.*, 2011. Lo anterior, puede generar conocimiento y tecnología para integrar el manejo de las poblaciones, así como

desarrollar estrategias para prevenir y manejar en este caso al HLB. La caracterización molecular de las poblaciones de *D. citri*, colectadas en diferentes regiones del país, son de ayuda relevante para establecer su origen y procedencia, y pueden ser la base para generar herramientas útiles en el manejo del HLB.

En los estudios de biología molecular donde esté involucrada la amplificación de alguna secuencia del genoma de algún individuo, es necesario contar con métodos de extracción del ADN eficientes, económicos, de fácil manejo y ahorro de tiempo. Los estudios de análisis genéticos de insectos de diferentes regiones del país pueden generar nuevo conocimiento sobre el insecto utilizando ADN mitocondrial el cual actualmente se utiliza en estudios de taxonomía y diferenciación entre especies morfológicamente parecidas Álvarez y Hoy 2000; Gómez *et al.*, 2009.

En estudios de diversidad y variabilidad genética entre poblacionales, los trabajos basados en el análisis del ADN, son una herramienta útil para conocer la estructura de poblaciones, flujo de genes, hibridación, biogeografía, en el establecimiento de relaciones filogenéticas y en estudios evolutivos Cánovas *et al.*, 2002, con la gran ventaja de ser fácilmente extraído, hay una gran cantidad de copias dentro de las células, por su pequeño tamaño y la herencia materna permite ser útil en la evaluación de la historia evolutiva de las poblaciones y entre grupos bastante relacionados Hoy, 1994.

El estudio de genética molecular en *D. citri* brinda una perspectiva al desarrollo de herramientas genéticas y estrategias novedosas de manejo dirigidas principalmente a reducir las poblaciones del psilido Marutani *et al.*, 2010

El ADN mitocondrial ha sido ampliamente utilizado como marcador molecular por su condición haploide, herencia matrilineal, alta tasa de evolución y la presencia de regiones conservadas y variables que facilitan la tipificación

molecular de individuos, (haplotipos), su uso para la diferenciación de los mismos y en diferentes escalas taxonómicas Behura 2006.

Los iniciadores utilizados en la técnica de PCR fueron diseñados para ciertos insectos, y debido al alto nivel de conservación de los sitios se pueden utilizar los iniciadores en diferentes grupos taxonómicos Simón. *et al.*, 1994. Las regiones del ADN mitocondrial citocromo oxidasa I y II son útiles para medir la variación genética en diversos grupos de insectos y la región 16S es útil en el estudio de análisis genético Lewter *et al.*, 2006.

El análisis de relaciones genéticas a partir del gen mitocondrial COI se ha convertido en el método preferido por su amplio rango en estudios taxonómicos, poblacionales y evolutivos Lunt, *et al.*, 1996. Mediante el análisis de 212 psilidos provenientes de 52 colecciones de 15 países utilizando marcadores específicos para el gen citocromo oxidasa 1 se registró la presencia de 8 haplotipos donde el más frecuente es Ccit-1 SWA. Boykin *et al.*, 2012. En México se ha reportado la existencia de 3 haplotipos López, *et al.*, 2012.

La tecnología generada en este trabajo se pretende que contribuya a reducir el daño directo ocasionado en las plantas de cítricos por *Diaphorina citri*; prevenir el establecimiento de epidemias causadas por *Ca. Liberibacter spp.*, así como favorecer el desarrollo de estrategias de manejo y control de la enfermedad, además de propiciar la sustentabilidad de la producción citrícola en México, atendiendo las demandas específicas de los productores citrícolas.

3. JUSTIFICACION

En México existen establecidas 560 mil hectáreas de cítricos principalmente de naranja dulce y limón especies que ocupan un 61.7% y 26.9% respectivamente del área plantada (FAOSTAT, 2004). La derrama económica que genera la comercialización de la fruta y derivados es de aproximadamente 13 millones de pesos anuales SIAP 2013.

El HLB representa una grave amenaza para la producción de cítricos en todo el planeta dañando profundamente la industria citrícola. La bacteria es transmitida por el psilido *D. citri* que se encuentra distribuido por todo el país, por lo que está actualmente catalogada como plaga cuarentenaria por la SAGARPA 2009. Es imposible en estos momentos erradicar el HLB y recuperar la salud del árbol, no existe variedad de cítrico o portainjerto resistente a esta enfermedad, por lo que los esfuerzos se centran en disminuir la presencia del psilido *D.citri*

Este proyecto constituye una iniciativa oportuna y de gran relevancia para la citricultura nacional, en el que se conjuntará tecnología y conocimiento sobre la problemática que esta enfermedad ocasiona en México;

El proyecto se centra en evaluar productos alternativos para el control del psilido, establecer las relaciones genéticas de las poblaciones que se encuentran en el país permitiendo contribuir en el desarrollo de estrategias de prevención y control de la enfermedad, además de propiciar la sustentabilidad de la producción citrícola en México, atendiendo las demandas específicas de los productores citrícolas.

4. HIPÓTESIS

El uso de productos naturales, de neem *Azadirachta indica* (Juss), orégano *Lippia graveolens* (Kunth), guayaba *Psidium guajava* (L.), mandarina cleopatra *Citrus reshni* (Hort ex Tan) y ajo *Allium sativum*(L.), es una alternativa viable para el control del vector del HLB el psilido *Diaphorina citri*. Además, con el uso de técnicas moleculares, es factible establecer las relaciones genéticas de poblaciones de *Diaphorina citri*, así como la detección y caracterización molecular del agente causal del HLB la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp.

5. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar alternativas de control y manejo del vector *Diaphorina citri*, así como la detección y caracterización molecular del agente causal del Huanglongbing la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp.

5.1 Objetivos particulares

Establecer la eficiencia de neem *Azadirachta indica* (Juss), orégano *Lippia graveolens* (Kunth), guayaba *Psidium guajava* (L.), mandarina cleopatra *Citrus reshni* (Hort ex Tan) y ajo *Allium sativum*(L.), en el control de *Diaphorina citri*.

Determinar las relaciones genéticas entre las poblaciones del vector *Diaphorina citri* de diferentes regiones de la República Mexicana.

Realizar la extracción del DNA a partir de plantas de cítricos y de *Diaphorina citri*.

Detectar y caracterizar mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la colecta de material vegetal y del insecto vector *Diaphorina citri*, se realizaron recorridos en diversas áreas cítricas del país y se inspeccionaron plantaciones para encontrar árboles con síntomas de la enfermedad. Los estados donde se realizaron las colectas, año de la colecta, tipo de muestra colectada y el número de muestras procesadas para el diagnóstico molecular del HLB se indican en la tabla 1.

Tabla 1. Tipo de muestra, estado, año de colecta y número de muestras procesadas para el diagnóstico del HLB.

Muestra	Estado	Año de colecta	Cantidad de muestras procesadas
<i>Naranja agrio</i>	Coahuila	2009	2
<i>Naranja agrio</i>	Tamaulipas	2009	17
<i>Naranja dulce</i>	Veracruz	2009	2
<i>Limón mexicano</i>	Yucatán	2009	45
<i>Limón mexicano</i>	Sinaloa	2009	2
<i>Limón mexicano</i>	Nuevo Leon	2010	5
<i>Limón mexicano</i>	Colima	2010	44
<i>Limón mexicano</i>	Colima	2010	27
<i>Limón mexicano</i>	Sinaloa	2011	21
<i>Limón mexicano</i>	CEGET	2011	21
<i>Limón Mexicano</i>	Colima	2011	12
<i>Diaphorina citri</i>	Coahuila	2009	1
<i>D. citri</i>	Veracruz	2009	1
<i>D. citri</i>	Sinaloa	2010	6
<i>D. citri</i>	Yucatán	2010	34
<i>D. citri</i>	Campeche	2010	1
<i>D. citri</i>	Colima	2010	22
<i>D. citri</i>	Sinaloa	2010	13
<i>D. citri</i>	Michoacán	2010	3
<i>D. citri</i>	Colima	2010	8
<i>D. citri</i>	Yucatán	2010	33
<i>D. citri</i>	Michoacán	2011	5
<i>D. citri</i>	Veracruz	2011	17
<i>Aceratagallia spp.</i>	Michoacán	2011	7

El material vegetal colectado fue transportado en papel de estraza junto con los psilidos contenidos en alcohol al 30% al Laboratorio de Fotoquímica y al

Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, para la extracción de ADN y la detección del agente causal HLB.

Los estudios de repelencia y letalidad se realizaron en el laboratorio de Control Biológico del Campo Experimental General Terán (CEGET), del Centro de Investigación Regional (CIRNE), perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

6.1. Detección de *Candidatus Liberibacter* spp.

6.1.1. Extracción del ADN en muestras de cítricos

Para la extracción del ADN de plantas e insectos se optimizó la técnica descrita por Almeyda *et al.*, 2001. Se utilizaron 200 mg de tejido fresco que se maceraron en mortero con nitrógeno líquido. A la muestra macerada se le agregó una solución de extracción 2M / CTAB precalentada a 65 °C (2 % p/v CTAB, 100 mM Tris – HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, 1 % p/v polivinilpirrolidona 40,000), con β mercaptoetanol a una concentración final del 0.2 %. Se incubó durante 30 min a 65 °C. Posteriormente se agregó un volumen de cloroformo (p/v considerando el peso del tejido inicial) y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. A la fase acuosa se le añadió 1 volumen de cloroformo, y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se extrajo la fase acuosa y se le agregó medio volumen de acetato de amonio (7.5 M), se dejó 10 min en hielo y se centrifugo por 10 min a 14,000 rpm a temperatura ambiente. Para precipitar los ácidos nucleicos se agregó 0.7 μ l de isopropanol y se incubo por 45 min a temperatura ambiente y después se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos. El precipitado se lavó con etanol al 70% frío, se dejó secar a temperatura ambiente, y se resuspendió en 100 – 200 μ l de solución amortiguadora TE pH 8.0 o en agua MQ estéril, el ADN se almacenó a 4 °C hasta su uso.

6.1.2. Extracción del ADN en psílicos

Se utilizaron 5 psílicos por muestra siguiendo la técnica de extracción desarrollada por Almeyda *et al.*, 2000, se agregaron 750µl de solución de extracción 2-ME/CTAB precalentada a 65 °C (2 % p/v CTAB, 100 mM Tris – HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, 1 % p/v polivinylpirrolidona 40,000), con β-mercaptoetanol a una concentración final de 0.2 % y se incubaron durante 45 min a 65 °C. Después del período de incubación se agregó un volumen de sevag (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1) y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa (parte superior) y se le agregó 1 volumen de sevag y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa (parte superior) y se le agregó 0.5 volumen de acetato de amonio (7.5 M) y 0.6 volumen de isopropanol y se dejó precipitar de 30 min a toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min. y se eliminó el sobrenadante, el precipitado se lavó dos veces con etanol al 70% frío (centrifugando a 10,000 rpm durante 15 min), el precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µl de agua mQ estéril y se almacenó a 4°C hasta su uso.

6.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa

Para la detección de la bacteria tanto en la planta como en el insecto vector se utilizó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando iniciadores específicos diseñados por Hoy *et al.*, 2001, los cuales, se indican en la tabla 2.

Tabla 2. Iniciadores utilizados para amplificar regiones específicas de la bacteria causante del HLB (Hoy *et al.*, 2011).

Región amplificada	Iniciadores
ARNr 16S de las especies <i>Ca.L. asiaticus</i> y <i>africanus</i>	OI1 (5´- GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA -3´) OI2c (5´-GCCTCGCGACTTTCGAACCCAT -3´) OA1 (5´- GCGCGTATTTTATAACGAGCGGCAGA -3´)
Operón β ribosomal de las especies <i>Ca.L. asiaticus</i> y <i>africanus</i> .	rplA2 (5´- TATAAAGGTTGACCTTTTCGAGTTT -3´) rplJ5 (5´-ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA -3´).
ARNr 16S de la especie <i>Ca. L. americanus</i> .	GB1 (5´-AAGTCGAGCGAGTACGCAAAGTACT-3´) GB3 (5´CTATATTTGCCAATCCATTAAGTTGG-3´)

Las reacciones de PCR se realizaron en tubos Ependorff de 0.5 ml, en un volumen final de 25 μ l a una concentración final de: Solución amortiguadora (1X), MgCl₂ (2mM), DNTP's (200 μ M), Taq DNA polimerasa (2.5 U), iniciadores (0.5 μ M c/u) y 50 ng de ADN Las reacciones se corrieron en un termociclador Thermo Scientific Px2. Las condiciones de temperaturas fueron: Un ciclo de 3 min 94°C, 35 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min de alineación a 56°C, 1 min de polimerización a 72°C y un ciclo final a 72°C por 10 min. Las muestras se fraccionaron en geles de agarosa al 1.5% durante 45 min a 100 volts y se tiñeron con bromuro de etidio para su análisis.

6.2 Obtención de los extractos etanólicos

Las especies vegetales evaluadas como repelentes o insecticidas contra *D. citri* fueron: neem *Azadirachta indica* (Juss), orégano *Lippia graveolens* (Kunth) guayaba *Psidium guajava* (L.), mandarina cleopatra *Citrus reshni* (Hort ex Tan) y ajo *Allium sativum* (L.). Los extractos etanólicos del neem, orégano, guayaba y mandarina cleopatra se obtuvieron de las hojas, en el caso del ajo se obtuvo del bulbo.

Para la obtención de los extractos se utilizaron 60g de muestra seca y molida, a la cual se le agregaron 300ml de etanol absoluto, se utilizó la técnica de soxhlet por reflujo continuo durante 40h. Transcurrido ese tiempo se dejó enfriar y se

filtraba, posteriormente se obtuvo el extracto crudo, concentrado y libre de etanol utilizando un rotavapor a 45°C hasta llegar a sequedad de la muestra. Como disolvente de los extractos se utilizó agua destilada. Se determinó evaluar las concentraciones de 50 y 500 ppm de cada extracto con 8 repeticiones de cada una. En el caso del aceite de orégano se utilizó la técnica de arrastre de vapor, utilizando 10g de muestra y 75ml de agua destilada en un matraz de fondo plano, se calentó a temperatura constante 100°C por un lapso de 2h, posteriormente se separó de la fase acuosa y se recolectó en un tubo eppendorf, manteniéndose a temperatura ambiente, el aceite se disolvió en Tween 20 y agua en una proporción (1:1:1), posteriormente se realizaron, las dosis al 2 y 4% de acuerdo a las condiciones reportadas por Pérez *et al.*, 2008.

6.2.1. Evaluación extractos etanólicos contra *D. citri*

Para la evaluación de los extractos etanólicos contra *D. citri*, se formaron grupos de 8 individuos depositados en botes de plástico con capacidad de 250ml, su captura se realizó mediante una aspiradora bucal. Los insectos se mantuvieron en cámaras de reproducción bajo condiciones controladas de temperatura de 26 °C y 16:8h de luz-obscuridad. Como planta hospedera del insecto se utilizó el naranjo agrio (*Citrus aurantium*) de 2 meses, sembradas en vasos de unicel, con sustrato Sunshine Peat Moos, el ras del vaso se cubrió con papel de estraza para evitar que el insecto tuviera contacto con el sustrato.

Antes de aplicar los extractos, los frascos que contenían a los insectos se mantuvieron durante 5 min. a 4°C para reducir al máximo su movilidad. Por otra parte las plantas fueron asperjadas con ayuda de un rociador con aproximadamente 0,137ml de cada uno de los tratamientos. Después de la aplicación, las plantas asperjadas y los insectos fueron colocados en botes trampa, y se mantuvieron en una incubadora a 26°C \pm 1 con humedad relativa de 52% y 16-8h de luz-obscuridad. Las variables evaluadas fueron: repelencia de

los psilidos a las 24h y 48h después de la aplicación (dda) y la mortalidad a las 48h dda.

Las dosificaciones evaluadas de aceite de orégano fueron seleccionadas con base en la información reportada por Pérez *et al.*, 2008, el aceite se disolvió en Tween 20 y agua en una proporción (1:1:1), posteriormente se realizaron las diluciones para obtener las dosis evaluadas (2 y 4%).

Para la comparación de los tratamientos evaluados se tuvieron tres testigos; en el primer testigo los insectos fueron tratados solamente con agua, el segundo testigo consistió en la aplicación a los insectos de Tween 20 al 2%, en el tercer testigo los insectos no tuvieron ningún tratamiento. Todos los tratamientos se exponen en la tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos y dosis evaluadas contra el psilido *D. citri*

Especie	Concentración
Orégano	50ppm
Orégano	500ppm
Ajo	50ppm
Ajo	500ppm
Mandarina cleopatra	50ppm
Mandarina cleopatra	500ppm
Guayaba	50ppm
Guayaba	500ppm
Neem	50ppm
Neem	500ppm
Aceite de orégano	2%
Aceite de orégano	4%

Se utilizó Tween, Agua y un tratamiento en Seco como testigos

Los análisis de varianza (ANOVA), se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS® System. Los valores promedios de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), para rango estudentizado.

6.3. Análisis genético de poblaciones de *Diaphorina citri*.

Para el análisis genético de las poblaciones de *D. citri*, se utilizaron psilidos colectados de los estados de Michoacán, Sinaloa, Yucatán, Campeche, Nuevo León y Veracruz.

En este trabajo se estandarizó e implementó la metodología de inmunocaptura-PCR, cuya primera fase consiste en la inmunocaptura del DNA del insecto en membranas de nylon cargadas positivamente. Para tal efecto, los insectos fueron macerados en un área limitada de las membranas, en este caso se utilizaron 5 psilidos por muestra. Posteriormente, el área de la membrana donde se realizó la inmunocaptura se recortó cuidadosamente y se colocó en el interior de un tubo eppendorf limpio y estéril y se le agregaron 100µl de buffer de glicina (Glicina 0.1 M, NaCl 0.05 M, EDTA 1 mM), las muestras se incubaron a 90° C por 10 min con homogenización en vortex cada 2 min, después del período de incubación las muestras se colocan en hielo o en congelación hasta uso en las pruebas de PCR.

La segunda fase de la metodología es la implementación de la técnica de PCR y en este trabajo se utilizaron los pares de iniciadores C2N/C2J: (5'-CCACAAATTTCTGAACATTGACCA-3')/(5'-ATTGGACATCAATGATATTGA-3') y LRN/LRJ: (5'-ACGAGAAGACCCTATGGAGC-3')/(5'-TGATTATGCTACCTTTGCAC-3'). Los iniciadores C2N/C2J, amplifican una región de aproximadamente 400 pares de bases del gen mitocondrial COII y los iniciadores LRN/LRJ, amplifican una región de aproximadamente 600pb del gen mitocondrial ARNr 16S.

Las reacciones de PCR se realizaron en tubos Ependorff de 0.5 ml, en un volumen final de 25 µl a una concentración final de: Buffer (1X), MgCl₂ (2.5 mM), DNTP's (200µM), iniciadores (12.5 pmol c/u), enzima Taq Polimerasa 1U

DNA y 50 ng de DNA. Las condiciones de las PCR para la amplificación de las muestras fueron: Un ciclo de 95° por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1min 30s y un ciclo final de 72°C por 10 min. Las muestras se fraccionaron en geles de agarosa al 1.5% por 45 min a 100 volts y se tiñeron con bromuro de etidio para su análisis bajo luz ultravioleta.

Las muestras amplificadas fueron purificados utilizando el kit comercial EZ-10 Spin column DNA gel Extracción de BioBasic Inc., de acuerdo a las especificaciones del fabricante y se enviaron al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México para su secuenciación.

Las secuencias obtenidas, fueron comparadas con todas las secuencias de los genes mitocondriales COII y ARNr 16S de *D. citri* reportadas en el Ge Bank para establecer sus relaciones genéticas y definir la presencia de haplotipos de este insecto en las regiones donde fueron colectados. Para tal efecto se utilizó a la distancia genética de Nei y Li 1979, mediante el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages).

7. RESULTADOS

7.1 Extracción de ADN

Se procesaron 198 muestras de plantas de cítrico que presentaban la sintomatología típica de la enfermedad producida por la bacteria *C. Liberibacter*, la figura 7 representa una muestra simbólica de la calidad del ADN extraído, de plantas de Limón mexicano, naranja dulce y naranja agria; posteriormente se estableció la concentración y calidad de cada una de las muestras para ser utilizadas en la detección de la bacteria por medio de PCR.

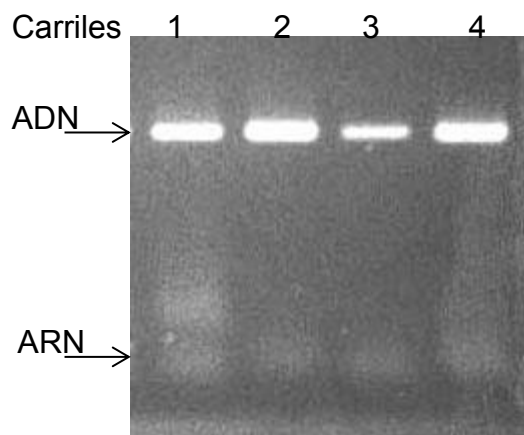


Figura 6. ADN extraído a partir de muestras vegetales de cítricos con síntomas de HLB. Carriles 1y 2: Limón mexicano, Carril 3: Naranja dulce, Carril 4: Naranja agria

Se procesaron 144 muestras de psilidos *D. citri* colectados en zonas donde se recolectaron las muestras de cítricos con sintomatología típica de la enfermedad producida por la bacteria *C. Liberibacter*, la figura 8 representa una muestra simbólica de la calidad del ADN extraído, de psilidos en dos estadios en forma adulta y ninfa del quinto estadio; posteriormente se estableció la concentración y calidad de cada una de las muestras para ser utilizadas en la detección de la bacteria por medio de PCR

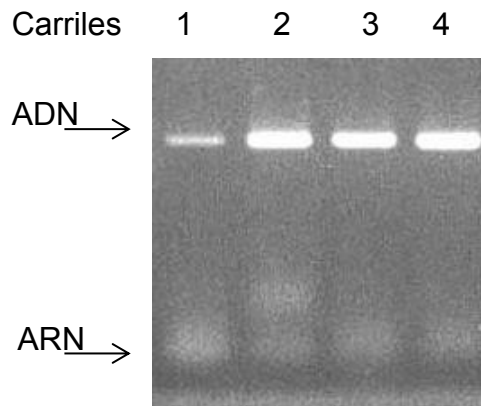


Fig. 7. ADN extraído de psilido *D. citri* Carriles 1 y 2 Adultos 3 y 4 ninfas

7.2 Detección de la bacteria *C. Liberibacter sp*

Para la detección de la bacteria se utilizaron tres pares de iniciadores OI1 y OI2C que amplifican la región ARNr 16S, sin obtener ningún resultado positivo de amplificación. Los iniciadores rplJ5 y rplA2 que amplifican la región del β operon ribosomal de *C. Liberibacter*, lograron amplificar dos muestras (figura 9), una en el psilido *D. citri* colectado en Sinaloa en el 2010 y una muestra de limón mexicano colectada en Colima en el 2011. El fragmento amplificado es de aproximadamente 703 pares de bases (pb), correspondiente al gen que codifica el operon β de la bacteria *Ca Liberibacter asiaticus*. El tercer par de iniciadores GB1 y GB3, son específicos para la cepa *C. Liberibacter americanus*, con los cuales no se obtuvieron amplificaciones.

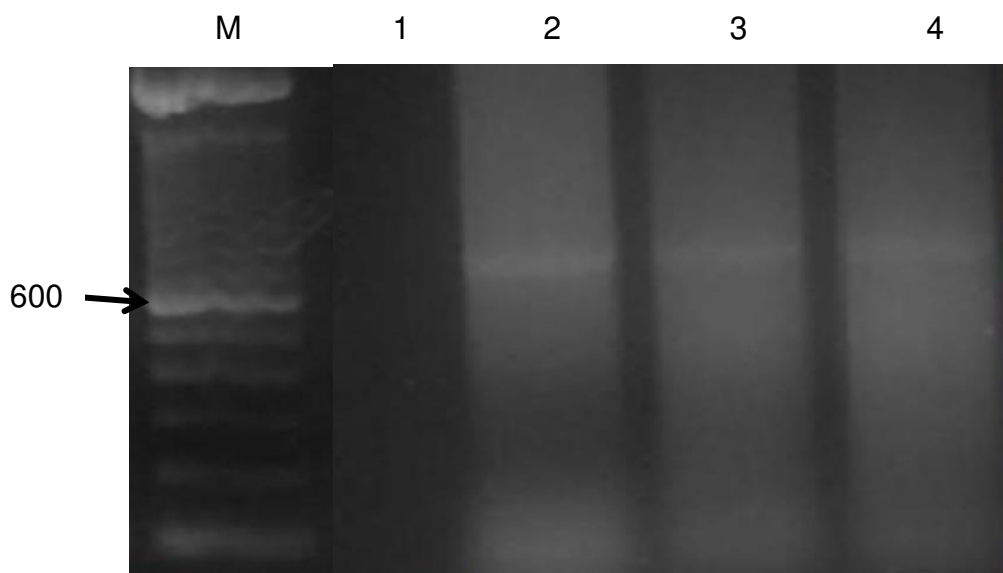


Figura 8. Detección de *Ca. Liberibacter asiaticus* utilizando los iniciadores rplJ5 y rplA2. Carril M: Marcador de Peso Molecular Ladder 100. Carril 1: Testigo negativo, Carril 2: ADN extraído de psilido, Carril 3: ADN extraído de limón mexicano, Carril 4: Testigo positivo.

7.3 Evaluación de extractos

Los mejores resultados de repelencia a las 24h se obtuvieron con el extracto crudo de orégano en dosis de 50 ppm, con el extracto crudo de ajo en dosis de 50 y 500 ppm y con el aceite de orégano al 4%, ya que el promedio de insectos presentes en las plantas tratadas fue de 1.37, 1.25, 2.0, y 2.0 respectivamente (Tabla 4 y Fig. 10). A las 48h dda los resultados de repelencia mantuvieron la misma tendencia y el promedio de insectos presentes en las plantas tratadas fue de 1.62, para él extracto crudo de orégano en dosis de 50 ppm, 1.0 y 1.75, para el extracto de ajo en dosis de 50 y 500ppm respectivamente, 2.0 y 1.75 para el aceite de orégano al 2% y 4% respectivamente.

Tabla 4. Valores promedios de psilidos presentes a las 24 y 48h dda en plantas de cítricos tratadas con extractos de diferentes especies de plantas y dosis evaluadas.

Tiempo dda	Especie	Concentración	Promedio de insectos presentes en las plantas	
24h	Orégano	50ppm	1.37	
	Orégano	500ppm	2.12	
	Ajo	50ppm	1.25	
	Ajo	500ppm	2.00	
	Mandarina cleopatra	50ppm	5.87	
	Mandarina cleopatra	500ppm	5.87	
	Guayaba	50ppm	6.00	
	Guayaba	500ppm	6.50	
	Neem	50ppm	6.62	
	Neem	500ppm	5.62	
	Aceite de orégano	2%	2.50	
	Aceite de orégano	4%	2.00	
	48h	Orégano	50ppm	1.62
		Orégano	500ppm	2.87
Ajo		50ppm	1.00	
Ajo		500ppm	1.75	
Mandarina cleopatra		50ppm	4.25	
Mandarina cleopatra		500ppm	6.00	
Guayaba		50ppm	4.50	
Guayaba		500ppm	4.12	
Neem		50ppm	5.75	
Neem		500ppm	6.00	
Aceite de orégano		2%	2.00	
Aceite de orégano		4%	1.75	

Los testigos mostraron los siguientes resultados a 24 y 48h de la aplicación respectivamente el tween 5.50 y 4.50, agua 6.00 y 4.37, testigo seco 6.12 y 5.87.

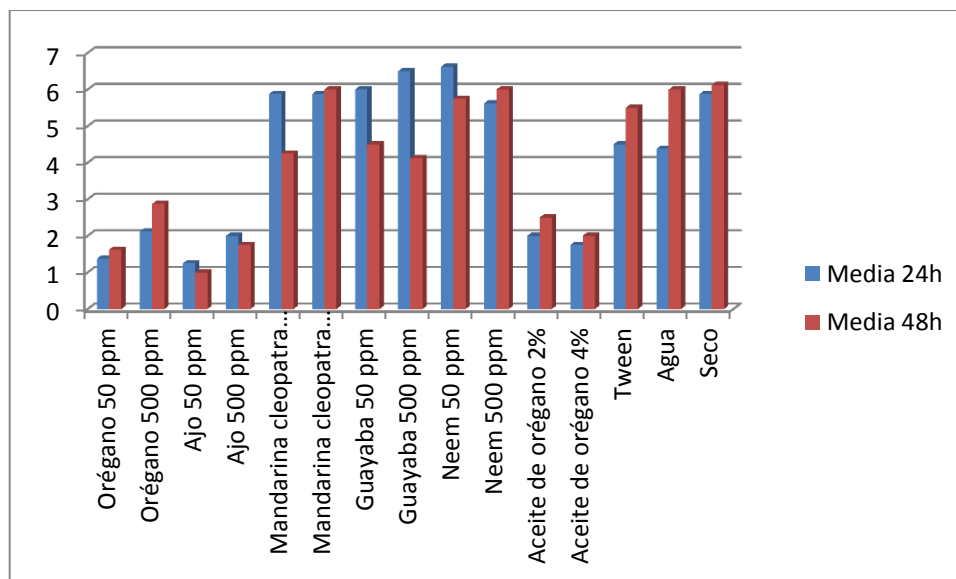


Fig. 9. Valores promedio de insectos presentes en las plantas tratadas con diferentes especies de plantas y dosis a la 24 y 48h después de la aplicación.

Con base en el análisis de varianza (ANOVA), se determinó diferencia altamente significativa entre tratamientos para el factor de repelencia a las 24h dda (Tabla 5). El coeficiente de correlación múltiple (R^2) muestra un valor positivo de 0.673409, este grado de asociación entre las variables testigos y tratamientos corroboran los resultados de alta significancia encontrados con el ANOVA.

Tabla 5. Análisis de varianza sobre la repelencia de insectos a las 24h después de la aplicación.

Fuente	g/l	S.C. Tratamientos	C.M.	Fcal	p-valor
Modelo	21	535.75833333	25.51230159	9.62	2.043
Error	98	259.83333333	2.65136054		$\alpha= 0.01$
Total	119	795.59166667			

$R^2= 0.673409$

C.V. 37.36

C.M.E.= 1.62

Mediante la prueba de Tuckey, los tratamientos se dividieron en dos grupos. El grupo A de azul incluye a los tratamientos de mandarina cleopatra en dosis de 50 y 500 ppm, guayaba en dosis de 50 y 500 ppm, neem en dosis de 50 y 500 ppm, y los tratamientos testigo (Tween, agua y testigo seco), los cuales no presentan diferencias significativas entre ellos y son los tratamientos con el

menor porcentaje de repelencia contra *D. citri* a las 24h dda (Fig. 9). El grupo B en rojo incluye a los tratamientos de orégano en dosis de 50 y 500 ppm, ajo en dosis de 50 y 500 ppm y al aceite de orégano al 2 y 4%, estos tratamientos no presentan diferencia significativa entre sí, pero si con los tratamientos que conforman el grupo A y son los tratamientos que presentaron los mejores resultados de repelencia para el psilido *D. citri* a las 24h dda (Fig. 9).

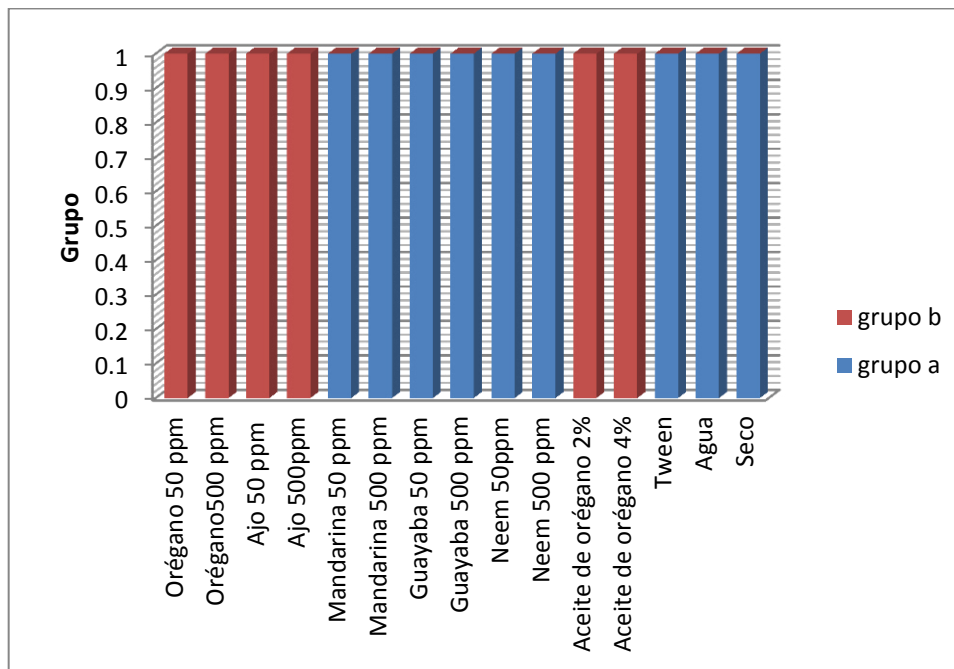


Fig. 10. Agrupación de tratamientos por medio de la prueba de Tukey para rango estudentizado (HSD) a las 24h después de la aplicación.

Con base en análisis de varianza (ANOVA), se detectó diferencia altamente significativa entre tratamientos para el factor de repelencia a las 48h dda (Tabla 6). El coeficiente de correlación múltiple (R^2) muestra un valor positivo de 0.534915, este grado de asociación entre las variables testigos y tratamientos corroboran los resultados de alta significancia encontrados con el ANOVA e indican que algunos de los tratamientos son diferentes en comparación a los testigos.

Tabla 6. Análisis de varianza sobre la repelencia de insectos a las 48h de exposición a los tratamientos

Fuente	g/l	S.C.	C.M.	Fcal	p-valor
Modelo	21	356.14166667	16.95912698	5.37	2.043
Error	98	309.65000000	3.15969388		$\alpha= 0.01$
Total	119	665.79166667			

$R^2 = 0.534915$ C.V. 46.88 C.M.E.= 1.77

Mediante la prueba de Tukey para rango estudentizado (HSD), se formaron 4 grupos de significancia (Fig. 12). El grupo A en azul incluye a los tratamientos de mandarina cleopatra a 50 y 500 ppm, guayaba a 50 y 500 ppm, neem a 50 y 500 ppm y los testigos Tween, agua y tratamiento seco los cuales no presentan diferencias significativas entre ellos y presentan valores bajos de repelencia. El grupo B en rojo incluye al extracto crudo de orégano a 500 ppm, mandarina cleopatra a 50ppm, guayaba a 50 y 500 ppm, al neem a 50 ppm y a los testigos Tween, agua y tratamiento seco, que presentan resultados no significativos estadísticamente. El grupo C en verde incluye a la mayoría de los tratamientos excepto al ajo a 50 ppm y a los tratamientos de mandarina cleopatra a 500 ppm, neem a 50 y 500 ppm y el tratamiento seco. El grupo D en morado incluye a los tratamientos de extractos de orégano a 50 y 500 ppm, ajo a 50 y 500 ppm y el aceite de orégano al 2 y 4% los cuales presentan los mejores valores de repelencia tanto a las 24h como a las 48h dda.

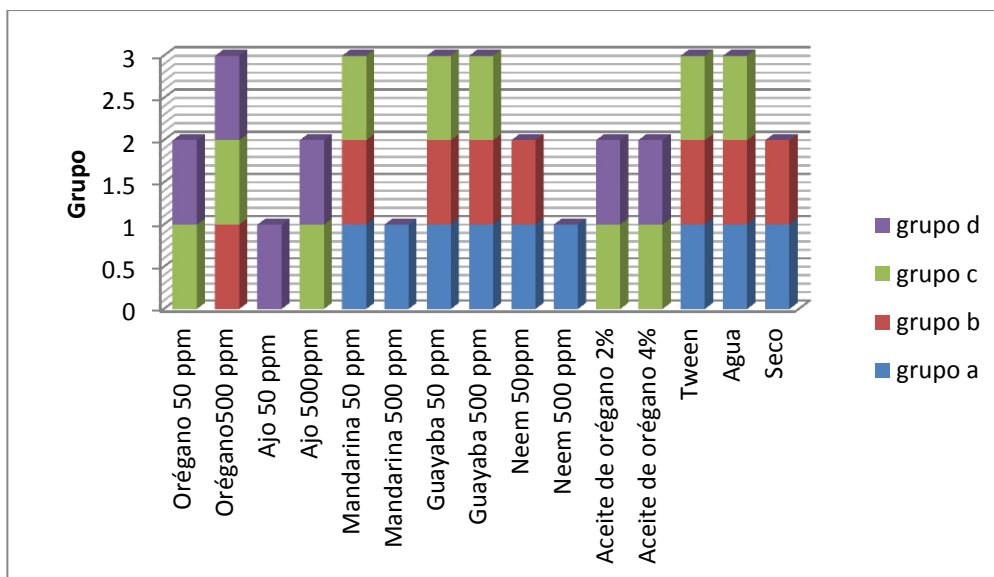


Fig. 11. Agrupación de tratamientos por medio de la prueba de Tukey para rango estudentizado (HDS) a 48h dda

Los mejores resultados de mortalidad de psilidos a las 48h dda se obtuvieron con el aceite de orégano al 2 y 4% y con los extractos crudos de orégano y de ajo, ambos a 50 ppm, con valores promedios de 5.30, 5.62, 4.50 y 4.87 insectos muertos respectivamente (Tabla 7 y Fig. 13)

Tabla 7 Valores promedios de mortalidad de psilidos a las 48h dda tratados con extractos de diferentes dosis y especies de plantas.

Tiempo	Especie	Concentración	Media
48h	Orégano	50ppm	4.50
	Orégano	500ppm	3.87
	Ajo	50ppm	4.87
	Ajo	500ppm	2.75
	Mandarina cleopatra	50ppm	3.75
	Mandarina cleopatra	500ppm	2.00
	Guayaba	50ppm	3.50
	Guayaba	500ppm	3.87
	Neem	50ppm	2.25
	Neem	500ppm	2.00
	Aceite de orégano	2%	5.37
	Aceite de orégano	4%	5.62

Los testigos utilizados en mortalidad a 48h de la aplicación muestran un efecto de 2.12 con tween, 2.75 con agua y el testigo seco 1.37 respectivamente.

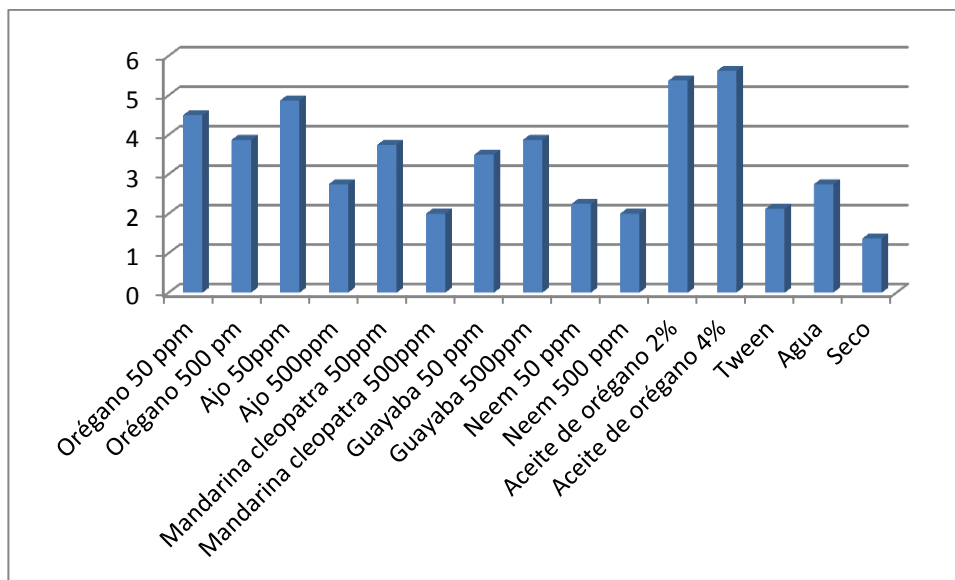


Figura 12. Valores promedios de psilidos muertos a las 48h dda, tratados con diferentes dosis y especies de plantas.

Con base en el análisis de varianza (ANOVA), se detectó diferencia altamente significativa entre tratamientos para los valores de mortalidad a las 48h dda (Tabla 8). El coeficiente de correlación múltiple (R^2) muestra un valor positivo de

0.369122, este grado de asociación entre las variables testigos y tratamientos mostró que algunos de los tratamientos evaluados son diferentes a los testigos.

Tabla 8. Análisis de varianza sobre la mortalidad de los psilidos a las 48h de exposición a los tratamientos

Fuente	g/l	S.C.	C.M.	Fcal	p-valor
Modelo	21	202.3500000	9.63452381	2.73	2.043
Error	98	345.8000000	3.52857143		$\alpha=0.01$
Total	119	548.12500000			

$R^2 = 0.369122$

C.V. 55.65

C.M.E.= 1.87

Con la prueba de Tukey para rango estudentizado se formaron 4 grupos de significancia (Fig.14). El grupo A en rojo incluye a la mayoría de los tratamientos excluyendo a la mandarina cleopatra a 500 ppm, neem a 50 y 500 ppm, al tween y al tratamiento seco. El grupo B en verde no incluye al aceite de orégano al 2 y al 4 % y tampoco se incluyen los tratamientos de mandarina cleopatra a 500 ppm, neem a 500 ppm, ni al testigo seco. El grupo C en morado no incluye a los tratamientos de aceite de orégano al 2 y 4% que muestran los mayores valores de mortalidad, tampoco incluye al testigo seco que es el tratamiento con los valores más bajos de mortalidad. El grupo D en celeste incluye a la mayoría de los tratamientos excepto al ajo a 50 ppm, y al aceite de orégano utilizado al 2 y 4%, lo cuales presentan las mayores valores promedio de mortalidad de psilidos.

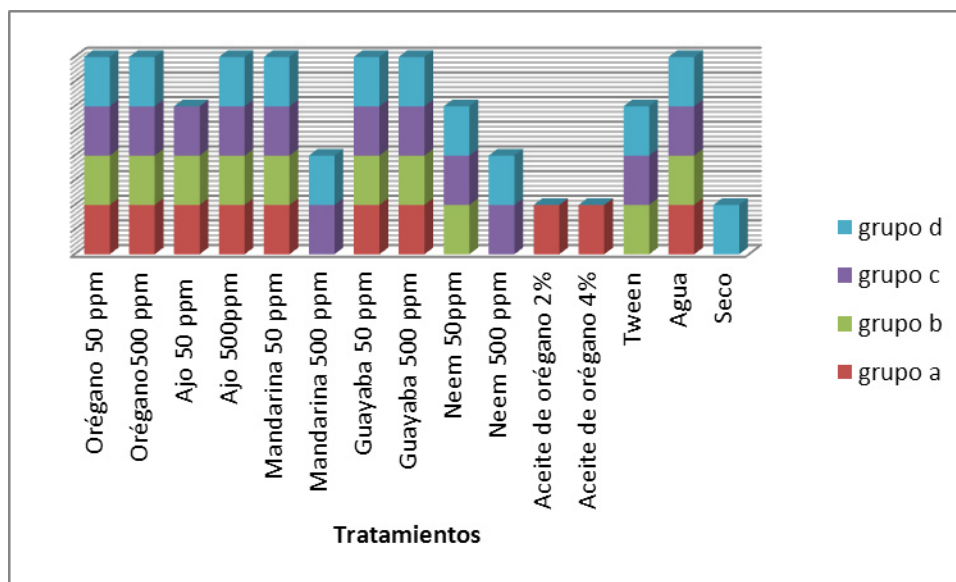


Figura 13. Agrupación de tratamientos en mortandad por medio de la prueba de Tukey para rango estudentizado (HDS) a 48h dda

7.4 Análisis genético del psilido *Diaphorina citri*

Para estudiar la variabilidad genética entre las poblaciones colectadas del psilido se implementó la técnica de inmunocaptura-PCR y se amplificaron fracciones de los genes mitocondriales COII y 16S. Se utilizaron los iniciadores C2N y C2J que amplifican una región de 400pb del COII y los iniciadores LRN y LRJ que amplifican una región de 600pb de ARNr 16S. En la figura 15 se muestran fragmentos de aproximadamente 400 pb que corresponden a la amplificación de un fragmento de la región mitocondria COII de algunas muestras de *D. citri*. En la figura 16 se muestran fragmentos de aproximadamente 600 pb que corresponden a la amplificación de un fragmento de la región del gen ARNr 16S de algunas muestras de *D. citri*, colectadas en diferentes estados de la República Mexicana.

Posteriormente los fragmentos amplificados, se purificaron y secuenciaron. Con la secuencia nucleotídica obtenida se generaron dendogramas de acuerdo a la distancia genética de Nei y Li 1979, mediante el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages).

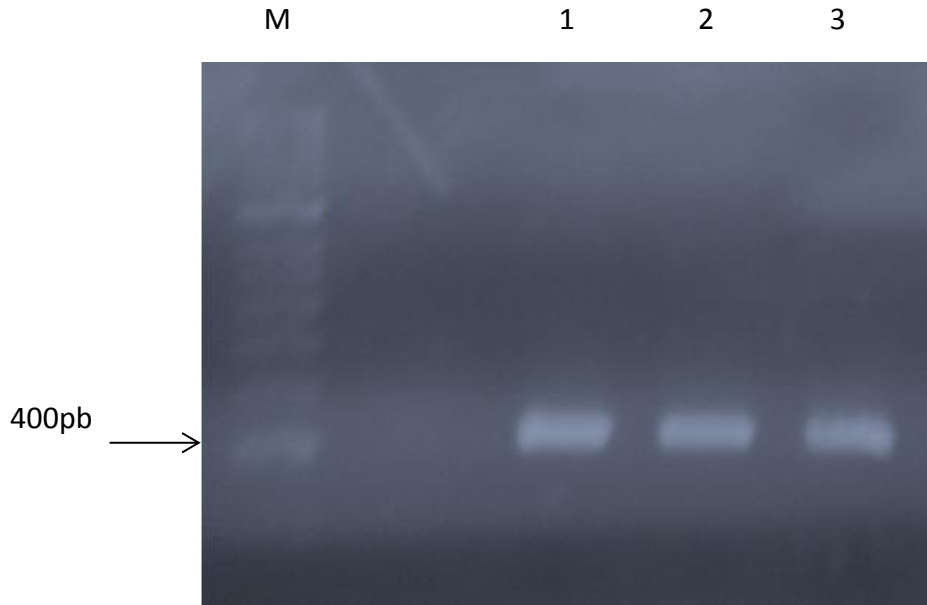


Fig. 15 Fragmentos amplificados del gen mitocondrial que codifica para la COII de *D. citri*. Carril: M. Marcador de Peso Molecular Ladder 100, Carril 1: *D. citri* colectado en Nuevo León, Carril 2: *D. citri* colectado en Yucatán, Carril 3: *D. citri* colectado en Michoacán.

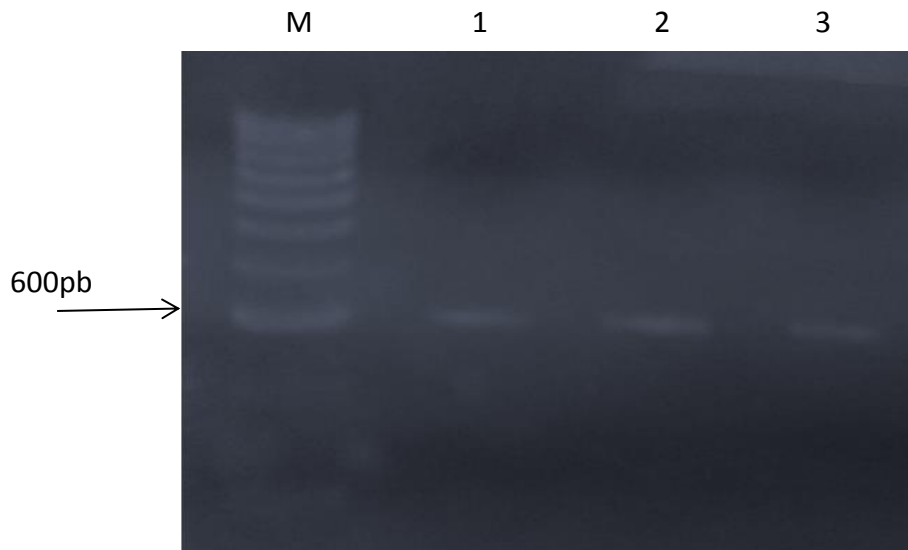


Fig. 16. Fragmentos amplificados del gen que codifica para el ARNr 16S de *D. citri*. Carril M: Marcador de Peso Molecular Ladder 100, Carril 1: *D. citri* colectado en Nuevo León, Carril 2: *D. citri* colectado en Yucatán, Carril 3: *D. citri* colectado en Michoacán.

Para la generación de los dendogramas, además de las secuencias de *D. citri*, obtenidas a partir de la amplificación de fragmentos del ARNr 16S con los iniciadores LRN y LRJ, también se incluyeron las secuencias de *C. qianli*, *C. chinensis* y *Homo sapiens* con la finalidad de establecer su similitud con las secuencias del psílido. El dendograma muestra la existencia de 3 grupos (Haplotipos) en las poblaciones de *D. citri* H1. Un grupo quedó conformado con las poblaciones colectadas en Culiacán, Veracruz y Michoacán, otro grupo quedó conformado con las poblaciones colectadas en Nuevo León y Campeche y un grupo quedó conformado solamente con la población colectada en Yucatán. Las distancias genéticas, muestran una similitud del 97% entre las poblaciones de *D. citri* (Figura 17).

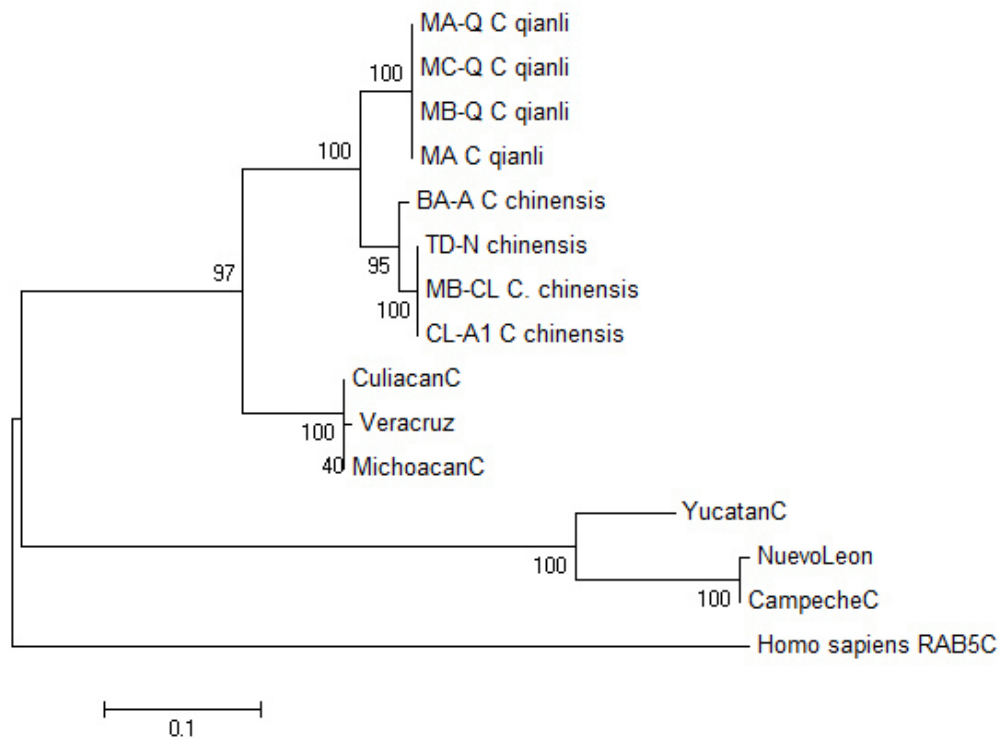


Figura 16. Dendrograma de distancias genéticas de Nei por el método de agrupamiento UPGMA inferido de un fragmento del gen mitocondrial ARNr 16S para poblaciones de *Diaphorina citri*.

Para la generación de un segundo dendrograma, además de las secuencias de *D. citri*, obtenidas a partir de la amplificación con los los iniciadores C2N y C2J, también se utilizaron las secuencias del gen de la citocromo oxidasa subunidad 2 de *Meligethes subaeneus*, *M. gracilis*, *Basilisa coronata*, *Aphis nerii*, *Acyrtosiphon kondai*, *Prociphilus fraxinifolii*, *Andrena calvata*, *Boreus nivoriundus* y *Homo sapiens* para determinar la relación y similitud que guardan con el psílido.

En el dendrograma generado las poblaciones de *D. citri* quedaron conformadas en dos grupos. En el primer grupo quedaron las poblaciones colectadas en Nuevo León, Campeche, Veracruz y Yucatán. Un segundo grupo quedó conformado únicamente con la población colectada en Michoacán (Figura 18).

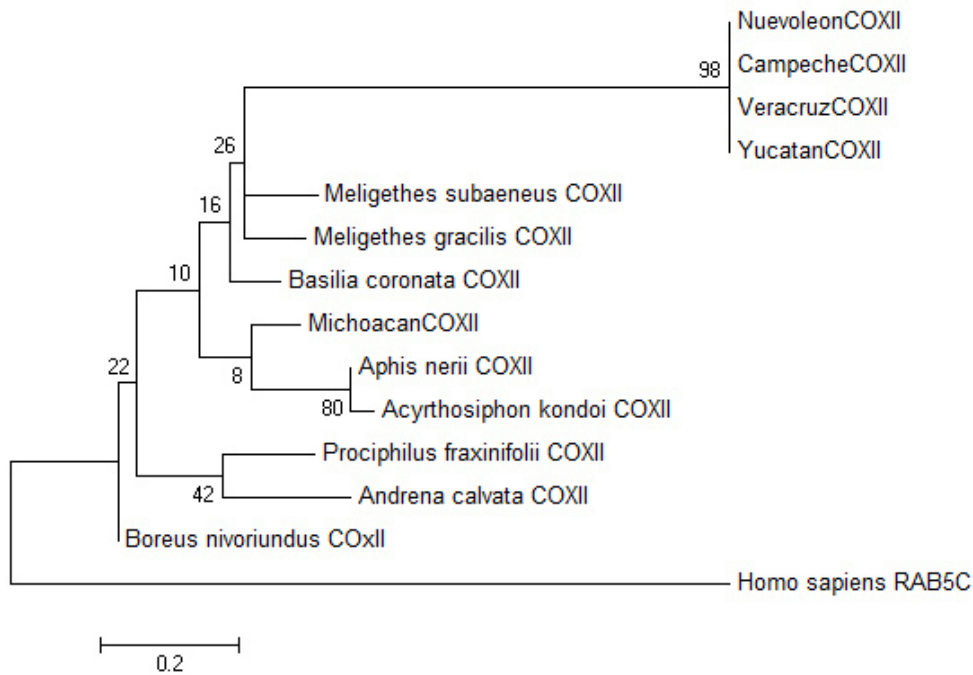


Figura 17. Dendrograma de distancias genéticas de Nei por el método de agrupamiento UPGMA inferido de un fragmento del gen mitocondrial COII para poblaciones de *Diaphorina citri*.

8. DISCUSIÓN

Existen diversos reportes de la efectividad del neem como anti alimentario, e insecticida. Silva *et al* en el 2007, reportaron su eficacia contra un gran número de especies. Sin embargo, en este trabajo los tratamientos a base de neem no presentaron eficiencia significativa de repelencia y mortalidad contra *D. citri*. Lo anterior pudo deberse a que se utilizaron hojas y posiblemente la cantidad de azadiractina presente fue mínima. Wandscheer *et al* en el 2004, mencionan que los frutos son la parte que contiene la mayor cantidad de azadiractina. Adan *et al* en el 1998, demostraron que el neem se requiere utilizar en concentraciones mayores a 50 mg/L para provocar efectos en los adultos. Según Mordue *et al.* (1993), aproximadamente el 65% de la azadiractina se descompone por efecto de los rayos ultravioleta en 14h y su concentración depende de diversos factores como temperatura, humedad, luz, etc. Ermel *et al.* (1987), mencionan que los insectos pueden presentar cierta resistencia a los extractos cuando es la primera vez que se ponen en contacto con las sustancias. En referencia a lo anterior, Niesbet *et al.* (1994), demostraron que los áfidos son poco susceptibles al efecto anti alimentario y requieren de una reingesta para obtener algún efecto.

Con la guayaba solamente se han realizado ensayos en trabajos de campo mediante el intercalado de estas plantas vivas dentro de plantaciones de cítricos y se obtuvieron resultados promisorios en cuanto a la repelencia y efectos en el desarrollo y ovoposición del psilido (Ichinose *et al.* 2008). Sin embargo, Lima, *et al.* (2009), demostraron que el aceite esencial de la guayaba presenta repelencia en orugas de *Spodoptera frugiperda*. Rouseff *et al.* (2008), demostraron que la sustancia responsable de la repelencia era el DMDS que se forma en los daños mecánicos de las hojas y tiene una duración de 10 min por lo que se considera un tiempo muy corto para que demostrar un efecto promisorio. Tsagkarakis *et al.* (2010), compararon el efecto de la mandarina cleopatra con otros cítricos sobre *D. citri* y reportaron que la mandarina

cleopatra provoca poco o nulo desarrollo de *D. citri* y no se ha encontrado el metabolito responsable. En este estudio solamente se utilizaron extractos etanólicos crudos restringiendo la extracción de componentes químicos de las plantas por lo que algunos componentes o principios activos pudieron no encontrarse en la evaluación.

Los extractos crudos de ajo y orégano en dosis de 50 ppm, mostraron ser eficientes en la repelencia de *D. citri* ó podrían estar afectando al insecto en comportamiento y facultad para alimentarse. Han *et al.* (2006), reportaron al ajo como planta insecticida y no con actividad anti alimentaria. Mann *et al.* (2011), utilizando una mezcla de di y trisulfuros 1:1 extraídos de ajo probaron la repelencia e inhibición de *D. citri* sin afectar a los enemigos naturales. Traboulsi *et al.* (2002), utilizaron concentraciones de 36mg/L de extracto crudo de orégano para poder encontrar efecto en el cuarto estadio larval del mosquito *Culex pipens*, en este trabajo se utilizaron dosis de 0.5mg y 5mg/L encontrándose resultados promisorios en la repelencia de *D. citri*. El aceite esencial del orégano generalmente es utilizado en estudios antimicrobianos (García 2006) y anti fúngicos (Hernández *et al.* 2008). Sin embargo, Viguera *et al.* (2006), mencionan que este producto no presenta actividad ovicida ni larvicida. En este estudio el aceite de orégano tanto al 2% como al 4% presentó buena actividad repelente de insectos adultos de *D. citri* y también se estableció su eficacia en la mortalidad del psilido en las dos concentraciones evaluadas.

Martínez *et al.* (2000), mencionan que los plaguicidas vegetales actúan más discretamente que los químicos sintéticos por lo que muchas veces las plagas no se eliminan a la primera aplicación, los plaguicidas naturales pierden su efecto pronto por lo que deben ser aplicados al momento de su preparación y más frecuentemente que los químicos sintéticos, su efecto y contenido de ingredientes activos dependen entre otros factores de la especie, época de recolección, variedad de la planta, influencia ambiental, forma de preparación, extracción y aplicación del producto. Chiasson *et al.* (2004), señalan que en los

programas de manejo integrado de plagas se puede hacer uso de extractos botánicos con propiedades repelentes, ya que presentan la ventaja de efectos residuales muy cortos y pueden ser compatibles con el control biológico. Por lo tanto, los extractos vegetales, sobre todo el orégano en su modalidad de aceite en las dosis evaluadas en este trabajo, se constituyen como una interesante alternativa para el control de plagas, con excelentes perspectivas futuras de aplicación a nivel de campo.

En este trabajo se realizaron 354 pruebas de detección de la bacteria en plantas que presentaban la sintomatología típica decoloración de hojas, fruto deforme, engrosamiento de la nervadura, etc. Se lograron detectar 2 muestras positivas, del estado de Yucatán y Colima, por medio de la técnica de PCR convencional, utilizando solo nervaduras centrales para la extracción del ADN. Hung *et al.* (2004), mostraron evidencia para determinar que la detección del HLB por PCR convencional es muy difícil debido a la baja de la concentración de la bacteria y a la heterogeneidad de su distribución en el árbol, hay que tomar en cuenta los métodos de extracción del ADN que aunque sean altamente eficientes en la extracción no se tiene la certeza de que en extracto se encuentre el ADN bacteriano o que es tan poca la concentración que pase inadvertido para las pruebas de detección por medio del PCR convencional. Wilson en el 1997, demostró que la aplicación de la metodología convencional se ve afectada por la presencia de inhibidores, proteínas, fenoles, iones, los cuales también pueden provocar falsos negativos en la detección de patógenos por medio de la técnica de PCR. También hay que tomar en cuenta que aún y cuando la planta presente la sintomatología típica puede deberse a deficiencias y/o a otras enfermedades que puedan provocar esta sintomatología. Por lo tanto, se demuestra que a la fecha la técnica más sensible para la detección del agente causal del HLB es la técnica de PCR en Tiempo Real. Neves en 2011, determinó que el fitoplasma del grupo 16Sr está asociado a los síntomas provocados por HLB y puede ser transmitido por chicharritas de la familia

Cicadellidae, lo que puede ocasionar la no detección de *Ca. Liberibacter* spp., en plantas con los síntomas típicos de infección con HLB.

Con los resultados obtenidos se determinó que los iniciadores específicos rplJ5 y rplA2 son más sensibles para la detección de la bacteria que los iniciadores OI1 y OI2C, ya que con estos últimos todas las pruebas de detección de la bacteria fueron negativas, posiblemente estos resultados son debido a concentraciones bajas de ADN del patógeno. Teixeira *et al.* (2008), mencionaron que al utilizar el PCR convencional o punto final, la detección se obtiene solo en muestras con síntomas evidentes de la enfermedad, ya que la concentración del ADN bacteriano está directamente relacionado con la severidad de los síntomas. Con los datos obtenidos en este trabajo se establece que la bacteria detectada mediante la técnica de PCR punto final, pertenece a la especie de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, debido a que la amplificación del fragmento de aproximadamente 703 pb corresponde únicamente a esta especie de la bacteria causante del HLB y está determinado por la especificidad del par de iniciadores utilizados en diferentes pruebas para su detección.

El dendograma generado a partir de las secuencias nucleóticas del gen que codifica para el ARNr 16S, indica la existencia de dos grupos, uno conformado por Nuevo León, Yucatán y Campeche y el otro conformado por las poblaciones colectadas en Culiacán, Veracruz y Michoacán. Sin embargo, no se observa una similitud del 100% entre las diferentes poblaciones que conforman los dos grupos. Por una parte, las poblaciones de Nuevo León y Campeche presentan mayor similitud entre ellas en relación con la población de Yucatán que quedo ubicada en un subgrupo, sin embargo, el porcentaje de similitud no es del 100% entre las dos primeras poblaciones, con estos resultados se puede inferir que este grupo al menos existen dos haplotipos y que a pesar de que estas poblaciones tienen un mismo origen, probablemente han ido sufriendo cambios en su secuencia nucleótica para condiciones de adaptación a las diferentes

zonas que invaden y/o el gen que codifica para el ARNr 16S por su naturaleza de poseer muchas copias sea más probable la existencia de mayor variabilidad nucleotídica, de manera tal, que estas regiones sean más apropiadas para su uso en el estudio de la diversidad genética al menos de *D.citri*. En el segundo grupo las poblaciones de Michoacán y Culiacán presentan un 100% de similitud, pero quedan agrupadas con las poblaciones colectadas en Veracruz que por su ubicación geográfica debería quedar ubicado en el grupo conformado por las poblaciones de Campeche, Yucatán y Nuevo León. Sin embargo, dada la alta homología existente entre las tres poblaciones que conforman el segundo grupo, lo más probable es que se trate de un mismo haplotipo o que la población de Veracruz pueda constituir un haplotipo diferente ya que su homología no es del 100% con las otras dos poblaciones del grupo, lo cual coincide con los resultados reportados por López *et al* en el 2005, quienes señalan que las poblaciones de *D. citri* encontradas en Veracruz y Nuevo León conforman un haplotipo diferente a los dos haplotipos encontrados en Yucatán.

El dendograma generado a partir de las secuencias nucleotídicas del gen ribosomal que codifica para la citocromo oxidasa II, indica la existencia de dos grupos, de *D. citri*, pero a diferencia de los resultados obtenidos con la secuencias nucleotídicas obtenidas a partir del gen que codifica para el ARNr 16S, el grupo conformado con las poblaciones colectadas en Yucatán, Nuevo León, Campeche, se le adiciona la población colectada en Veracruz. El segundo grupo obtenido con el gen que codifica para la COII quedo conformado solo por la población colectada en Michoacán. Estos resultados son concordantes con los orígenes de colecta y de la posible ruta de migración seguida por el psilido, el cual fue detectado por primera vez en el año de 2002 en el estado de Campeche y se asume su ruta migratoria hacia el resto del país, siguiendo las plantaciones comerciales de cítricos en todos los demás estados de la República Mexicana.

Las secuencias de los fragmentos mitocondriales amplificados muestran una baja diversidad genética demostrando que se trata de la misma especie. Estudios similares basados en la amplificación del gen mitocondrial que codifica para la Citocromo Oxidasa I (COI), señalan que en la República Mexicana existen 3 haplotipos en las poblaciones de *D. citri* y establecen como punto de introducción a la Península de Yucatán por presentar dos haplotipos (López et al 2005), los cuales son diferentes a los encontrados en Veracruz y Nuevo León. En este trabajo también se detectó diferencias nucleótidas en las poblaciones colectadas en Campeche, Yucatán y Nuevo León al utilizar la secuencia nucleótida del gen que codifica para el rRNA 16S, lo que indica la existencia de dos haplotipos en la Península de Yucatán y otro haplotipo conformado con las poblaciones de Culiacán, Michoacán y Veracruz o probablemente en estas últimas poblaciones existan dos haplotipos al no encontrarse un 100% de similitud en su secuencia nucleótida y un haplotipo este conformado por las poblaciones de Culiacán y Michoacán y el otro por las poblaciones de Veracruz, lo cual corroboraría la hipótesis un punto de entrada distinta de *D. citri* en México..

A pesar de que las regiones mitocondriales son altamente conservadas y que la similaridad encontrada es del 98%, en estudios futuros de caracterización molecular o de diversidad genética de un mayor número de colectas de *D. citri*, se recomienda usar los iniciadores utilizados en este trabajo, los cuales amplifican regiones de los genes que codifican para el rRNA 16S y para la COII, ya que se detectó mayor variación genética a la reportada en otros estudios donde utilizaron iniciadores diferentes.

9. CONCLUSIONES

Se lograron desarrollar alternativas de control y manejo del psilido *Diaphorina citri*,

El extracto de Ajo en dosis de 50 ppm se considera el mejor producto para la repelencia contra *Diaphorina citri*.

El aceite de orégano al 4%, presentó los mejores resultados de mortalidad contra *Diaphorina citri* y se le considera con buen potencial para su utilización a nivel de campo.

El método de extracción del ADN de plantas de cítricos y del psilido *Diaphorina citri* optimizado en este trabajo, fue eficiente, ya que se logró la detección molecular de *Candidatus Liberibacter asiaticus* y la caracterización molecular de *Diaphorina citri*.

La técnica de inmunocaptura-PCR optimizada en este trabajo disminuye costo y tiempo en la amplificación de fragmentos del ADN de *Diaphorina citri*.

Mediante el análisis de la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para el ARNr 16S y la Citocromo Oxidasa II de *D.citri*, se estableció la presencia de al menos tres haplotipos en las poblaciones estudiadas.

10. LITERATURA CITADA

- ACIAR.; 2008. The guava effect a new tool in the fight against citrus greening. In Vietnam Achievements. ACIAR/ 2007-2008 Report
- Adan A, Soria J, Del Estal P, Sanchez CB, Viñuelas E. 1998. Acción diferencial de dos formulaciones de azaridactina sobre los estados de desarrollo de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) Boletín Sanidad Vegetal Plagas ISSN 0213-6910 24(4): 1009-1017 Source: OAI.
- Aguirre VY, Delgado V. 2010. Pesticidas naturales y sintéticos. Revista Ciencia 13(1): 43-53.
- Alemán JHB, Baños H, Ravelo J. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad huanglongbing: una combinación destructiva para la producción citrícola. Protección vegetal 22:154-165
- Almeyda LI, Rocha MA, Piña J, Soriano JP. 2001. The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization for detection of phytoplasmas in different plant species in México. Revista Mexicana de Fitopatología 19:1-9
- Alvarez JM, Hoy MA. 2000. Molecular markers in classical biological control of the citrus lafminer: Taxonomic and Ecological evaluations, First International Symposium on Biological Control of Arthropodos. Honolulu Hawaii 75-89.
- Amoros CM. 2003. Producción de Agrios. Mundi- Prensa libros Madrid, España 145-146.

- Aurambout JP, Finlay KJ, Luck J, Beattie GAC. 2009. A concept model to estimate the potential distribution of the Asiatic citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama) in Australia under climate change- A means for assessing biosecurity risk. *Ecological Modelling Australia*. 220:2512-2524.
- Aubert B, Hua XY. 1990. Monitoring flight activity of *Diaphorina citri* on citrus and *Murraya* canopies. *In*: B. Aubert, S. Tontyaporn, and D. Buangsuwon (eds.). 4th International Asia Pacific Conference on Citrus Rehabilitation. Chiang Mai, Thailand. 181-187.
- Banchio E, Valbdares GD, Palacios S, Carpinella C. 2003. Effects of *Melia azadarach* (Meliaceae) fruit extract on the leaf miner *Liriomyza huidobrensis* (Diptera:Agromyzidae) assessment in laboratory and field experiments. *Annual Biology* 143: 187-193.
- Bassanezi RB, Montesino LH, Stuchi ES.2009. Effects on Huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*. 125:565-572
- Behura SK. 2006 Molecular markets systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular ecology* 15(11):3087-3113.
- Boykin LM, De Barro P, Hall DG, Hunter WB, Mckenzie CL, Powell CA, Shatters RG. 2012. Overview of worldwide diversity of *Diaphorina citri* Kuwayama mitochondrial cytochrome oxidase 1 haplotypes: two Old World lineages and a New World invasion. *Bulletin of Entomological Research* 102:573-582.
- CABI/EPPO. 2001. *Diaphorina citri*. Distribution maps of plant pests, Map. No.334. Wallingford, UK: CAB International.

- Canovas FP, Serrano J, Galian J. 2002. Variabilidad del ADN mitocondrial en poblaciones de *Aphis mellifera* Iberica de Galicia. España. Archivos de Zootecnia 51 (196): 441-448.
- Capataz TJ, Orozco SF, Vergara RR, Hoyos SR. 2007. Efecto antialimentario de los extractos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith en condiciones de laboratorio. Revista Facultad Nacional de Agronomía. Medellin. 60(1): 3703-3715
- Capoor SP, Rao DG, Viswanath SM. 1974. Greening disease of citrus in the Deccan Trap Country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. In Weathers LG, Cohen M (editor). Proceedings of the 6th Conference of the International Citrus Virology, University of California, Division of Agricultural Sciences. 43-49.
- Catling HD. 1970. Distribution of the psyllid vectors of citrus greening disease with notes on the biology and bionomics of *Diaphorina citri*. FAO Plant protection Bulletin. 18:8-15.
- Chiasson H, Bostanian NJ, Vincent C. 2004. Acaricidal properties of a *Chenopodium* based botanical. Journal Economic Entomology. 97:1373-1377.
- Chiou-nan C. 1998. Ecology of the Insect Vectors of Citrus Systemic Diseases and Their Control in Taiwan. Food and Fertilized Technology Publication Database. Disponible en: <http://www.agnet.org/library/eb/459a/>
- Cortez ME. 2007. Elaboración de Insecticidas naturales, para el control de la mosca blanca y otras plagas domésticas. Campo experimental Valle del Fuerte INIFAP. <http://www.fps.org.mx>.

- Da Graca JV. 1991. Citrus greening disease. Annual Revist. Phytopathol, 29:109-136
- Da Graca JV, Korsten L. 2004. Citrus huanglongbing: Review, present status and future strategies, S.A.M.H. Naqui(ed). Diseases of fruits and vegetables, 1: 229-245.
- Da Graca JV. 2008. Biology, history and world status of huanglongbing. 1er Taller Internacional sobre huanglongbing de los citricos (*Candidatus Liberibacter* spp.) y el psilido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). Sonora, México. 1-7.
- Das AK, Rao CN, Singh S. 2007. Presence of citrus greening (Huanglongbing) disease and its psyllid vector in the North-Eastern region of India confirmed by PCR technique. Current Science. 92:12 1759-1763
- De Rojas M, Riazzo C, Callejon R, Guevara D, Cutillas C. 2011. Morphobiometrical and molecular study of two populations of *Demodex folliculorum* from humans. Parasitology Research 110:227-233.
- Dugravoit S, Grolleau F, Macherel D, Rochetaing A, Hue B, Sankiewicz M, Huignard J, Lapied B. 2003. Dimethyl disulfide exerts insecticidal neurotoxicity through mitochondrial dysfunction and activation of insect K-ATP channels. Journal of Neurophysiology 90(1): 259-270.
- Ermel K, Pahlich E, Schumutterer H. 1987. Azadirachtin content of neem seed kernels from different geographical locations and its dependence on temperature, relative humidity and light. In: Proc 3rd. Int. Neem conference. Nairobi 171-184.

- Esparza GD, López JC, Villanueva JA, Osorio FA, Otero GC, Camacho ED. 2010. Concentración de Azadiractina, efectividad insecticida y fitotoxicidad de cuatro extractos de *Azadiractina indica* A. Juss. *Agrociencia* 44: 821-833.
- Etxeberria E, González P, Dawson W, Spann T. 2007. An iodine-bases starch test to assist in selecting leaves for HLB testing. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/HS375>.
- FAOSTAT. 2004. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Magazine online Disponible en: [http:// faostat.fao.org](http://faostat.fao.org)
- Fuentes V. 2000. Manual de cultivo y conservación de plantas medicinales. Tomo II. Ed. Centenario. S. A. Santo Domingo 5-172.
- Fung YC, Chen CN. 2006. Effects of temperature and host plant on population parameters of the citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama). *Formosan Entomología* 26:109-123.
- Gajmer T, Singh R, Saini RK, Kalidhar SB. 2002. Effect of methanolic extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and bakain (*Melia azadarach* L.) seeds on ovoposition and egg hatching of *Earias vitella* (Fab) (Lepidoptera:Joctuidae). *Journal Applied Entomology* 136:238-243
- Gao SJ, Garnier M, Bové JM. 1993. Production of monoclonal antibodies recognizing most Asian strains of the greening BLO by in vitro immunization with antigenic protein purified from de BLO. Proceedings of the 12th Conference of the International Organization for Citrus Virology. Riverside, Calif. 244-249

- Garnier M, Gao SJ, He YL, Villechanoux S, Gandar J, Bové JM. 1991. Study of the greening organism (GO) with monoclonal antibodies: serological identification, morphology, serotypes and purification of the GO. Proceedings of the 11th Conference of the International Organization for Citrus Virology. Riverside. Calif. 428-435
- Garnier M, Bové JM. 2000. huanglongbing (Greening), In: L.W.Timmer; S.M.Garnsey; J.H. graham (eds.) Compendium of citrus diseases. Second edition. APS. Press. St. Paul, Minnesota. 46-48.
- García CL, Alonso RSE, Rodríguez MR, Martínez RE, Ramírez BP, Torres MJV, Castro B. 2008. Actividad antimicrobiana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple. 3era. Reunión nacional sobre orégano RESPYN edición especial #1, Coahuila, México, 34-35.
- Giraldo HV, Vargas A, Sarmiento A, Hernandez E, Amaya F, Ramirez M, Ramirez F, Contreras E. 2006. Evaluación de bioplaguicidas para el manejo del saltahojas verde de la caña de azúcar (*Saccharosydne saccharivora* (Westwood) (Hemiptera: Delphacidae) en el Valle San Antonio Ureña, Tachira, Venezuela. Agronomía Tropical 56 (2): 253-276.
- Glauser G, Guillaume D, Grata E, Bocard J, Thiocone A, Carrupt P, Veuthey J, Rudaz S, Wolfender JL. 2008. Optimized liquid chromatography-mass spectrometry approach for the isolation of minor stress biomarkers in plant extracts and their identification by capillary nuclear magnetic resonance. At the microgram scale. J. Chromatogr. A. 1180(1): 90-98.
- Gómez PLM, Giraldo C, López A, Uribe S. 2009. Diferenciación morfológica y molecular de *Oleria maknena* (Hewitson) y *Oleria fumata* (Haensch) (Lepidoptera: Ithomiinae) Neotropical Entomology 38(5): 616-623

Halbert SE.1999. Asian citrus psyllid A serious exotic pest of Florida citrus. Florida. Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, university of Florida. Disponible en: <http://doacs.state.fl.us/pi/enpp/ento/dcitri.htm>.

Halbert SE, Manjunath KL. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Entomologist. Florida USA.* 87 (3): 330-353.

Han MK, Kim SI, AhnYJ. 2006. Insecticidal and antifeedant activities of medicinal plant extract against *Attagenus unicolor japonicas* (Coleoptera: Dermestidae). *Journal Stored Products Research.* 42: 15-22.

Hernández T, Canales M, Garcia AM, Duran A, Meraz S, Dávila P, Ávila JG. 2008. Antifungal activity of the essential oils of two Verbenaceae *Lantana achyranthiifolia* and *Lippia graveolens* of Zapotitlan de las Salinas Puebla (Mexico). *Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas Soc. Latinoamericana de Fitoquímica. Mexico.* 7 (4): 203-207.

Hocquellet A, Toorawa P, Bové J,M, Garnier M. 1999. Detection and identification of the two *Candidatus Liberibacter* sp. Associated with citrus huanglongbing by PCR Amplification of ribosomal protein genes of the beta operon. *Molecular Cellular. Probes* 13: 373-379.

Hodkinson I. 2009. Life cycle variation and adaptation in jumping plant lice (Insecta: Hemiptera: Psylloidea): a global synthesis. *Journal of Natural History,* 43, 65–179

Hoy MA. 1994. *Insect Molecular Genetics. An introduction to principles and applications.* Academic Press, Inc. California. USA. 546

- Hoy MA, Jeyaprakash, Nguyen R. 2001. Long PCR is a sensitive method for detecting *Candidatus liberibacter* spp. In parasitoids undergoing risk assessment in quarantine. *Biological Control* 22(3)278-287.
- Hung C, Chen M, Hsu S, Su H. 2004. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. *Plant Pathology*. 53. 96-102.
- Ichinose K, Bang DV, Dien LQ. 2008. Better management for citrus greening: chemical-uses or guava interplanting In: Proceeding of the International Research conference on Huanglongbing, Orlando, Florida. 308-309.
- Jagoueix S, Bové JM, Garnier M. 1996. Techniques for the specific detection of the two Huanglongbing (greening) *Liberibacter* species: DNA/DNA hybridization and DNA amplification by PCR In. Proceedings of 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside. California, USA. 384-387.
- Kell D, Brown M, Davey H, Dunn W, Spasic I, Oliver S. 2005. Metabolic footprinting and systems biology: The medium is the message. *National Rev. Microbial.* / AOP. 1- 9.
- Khalfi O, Sahraoui N, Bentahar F, Boutekedjiret CH. 2008. Chemical composition and insecticidal properties of *Origanum glandulosum* (Desf.) essential oil from Algeria. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88 (9): 1562-1566.

- Knigheten S, ReddingJ, Feiber D, Compton L. 2005. U.S. Department of Agriculture and Florida Department of Agriculture confirm detection of citrus greening. Disponible en:
http://www.doaes.state.fl.us/press/2005/09022005_2.html
- Lamiri A, Lhaloui S, Benjilali B, Berrada M. 2001. Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly *Mayetiola destructor* (Say). Field Crops Research 71, 9-15.
- Lewter J, Szalanski AL, Nagoshi RN, Meagher RL, Owens CB, Luttrell RG. 2006. Genetic variation within and between strains of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Fla. Entomology 89: 63-68.
- Li C, Weiss D, Goldschmidt E. 2003. Girdling affects carbohydrate-related gene expression in leaves, bark and roots of alternate-bearing *Citrus rhesus*. Ann. Botanical. 92:137-143.
- Lima RK, Da Graca MD, Dos Santos CD, Campos JM, Pereira DK, Do Nascimento EA. 2009. Caracterizacao química do oleo esencial de folhas de goiabeira (*P. guajava* L.) e seus efeitos no comportamento da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Ciencia Agrotecnic 33:1413-1417.
- Llorens JM. 2007. Biología de los enemigos naturales de las plagas de cítricos y efectos de los productos fitosanitarios. Dossiers Agraris ICEA Enemies naturals de plagues en diferents cultius a Catalunya; Disponible en:
<http://icea.iec.cat/pdf/Dossier6.pdf>.

- López JI, Loera J, Miranda MA, Reyes MA, Rocha MA. 2004. Manejo integrado de plagas de cítricos. En: Memorias del simposio internacional manejo fitosanitario del cultivo de los cítricos. Sociedad Mexicana de Fitopatología, Veracruz, México.
- López JI, Peña MA, Rocha MA, Loera J. 2005. Ocurrencia en México del psílido asiático *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae). Memorias del VII Congreso Internacional de Fitopatología. Chihuahua, México. 68
- López PJ, Gonzales AH, López JI. 2012. Variación genética de poblaciones de *Diaphorina citri* kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en México, determinada con el marcador COI. Pag 16-22. In: J. Isabel López-Arroyo, Mario A. Rocha-Peña (eds.). 3er. Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. Veracruz, México
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: Evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* 5:153-165.
- Mann RS, Rouseff RL, Smoot JM, Castle WS, Stelinski LL. 2011. Sulfur volatiles from *Alliums* spp. affect Asian citrus psyllid *D. citri* kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) response to citrus volatiles. *Bulletin of Entomology Research* 101(1): 89-97.
- Martinez JV, Bernal H, Caceres A. 2000. Fundamentos de la agrotecnología en cultivo de plantas medicinales iberoamericanas. Santafé de Bogotá, Colombia. CAB-CYTED 39-48.
- Marutani HM, Hunter WB, Hall DG. 2010. Gene response to stress in the Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist* 93(4):519-525.

- McFarland C, Hoy M. 2001. Survival of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), and its two parasitoids, *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) and *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae), under different relative humidities and temperature regimes. Fla Entomol. 84:2. 227-233.
- Mead F. 1977. The Asiatic citrus psyllid. *Diaphorina citri* Kuwayama (homptera: Psyllidae) Fls. Dep. Agric Consumer Servi. Division of plant industry. Entomol. Circular. 180:4.
- Michaud JP. 2004. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. Biological Control 29(2): 260-269.
- Mordue AJ, Blackwell A. 1993. Azadirachtin: an unupdate Journal Insect Physiology 39: 903-924.
- Neves RM. 2011 Cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) potenciais vetoras de um fitoplasma (grupo 16SrIX) asociado a sntomas de Huanglongbing dos citros, suas plantas hospedeiras e quantificao do patgeno. Tesis Doctorado. Escola Superior de Agricultura Lquiz de Queiroz. Brazil.
- Nei M, Li W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of sciences of the united states of America 76:5269-5273
- Nisbet AJ, Woodford JAT, Strang RHC. 1994. The effects of azadirachtin-treated diets on the feeding behaviour and fecundity of the peach-potato aphid, *Myzus persicae* Entomologia Experimentalis et Applicata 71 (1): 65-72

- OEPP/EPPO. 1988. Data sheets on quarantine organisms No. 151, citrus greening bacterium and its vectors *Diaphorina citri* and *Trioza erytraeae*. EPP/EPPO Bulletin 18:497-507
- Pérez GS, González MG, Mere AR. 2008. Repelencia y letalidad con aceite de orégano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri*) en *Varroa destructor*. 3ra. Reunión Nacional sobre Orégano RESPYN edición especial #1, Coahuila, México, 16-17.
- Pérez IA, Vázquez SG, Pérez D, De la Rosa O, Salazar E. 2009. Huella genética de Genotipos Silvestres y comerciales de *Passiflora* spp. Utilizando RAPD. Bioagro 21 (3) 203-208pp.
- Quintos EM, Gonzales CM, González GMC, Hernández L. 2005. Efecto acaricida de cuatro extractos crudos de maleza contra *Eotetranychus lewisi* McGregor (Acari: Tetranychidae). Disponible en: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx>.
- Qureshi JA, Stansly PA. 2008. Rate, placement, and timing of aldicarb applications to control Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in oranges. Pest Management Science 64:1159-1169.
- Ramos CA, González VA, Soto MH, Engleman EM, Rodríguez PA. 2004. Variación en contenido de Azadiractina en frutos de margosa durante su desarrollo. Revista Fitotecnia Mexicana 27(1): 81-85.
- Roderick GK. 1996. Geographic structure of insect populations: gene flow phylogeography and their uses. Annu Rev. Entomol. 41: 325-352

Roistacher CN. 1991. Greening. En: Graft-transmissible disease of citrus. Handbook for detection and diagnosis. IOCV-FAO eds. ROMA 35-42.

Rouseff RL, Onagbola EO, Smoot JM, Stelinski LL. 2008. Sulfur volatiles in guava (*Psidium guajava* L.) leaves. Possible defense mechanism. Journal Agriculture Food Chemical 56 (19): 05-10.

SAGARPA. 2009. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx>

Salas J. 2001. Eficiencia de un repelente basado en ajo para la reducción poblacional de la mosca blanca *Bemisia tabaci* Agronomía Tropical 51 (2): 163-174.

SENASICA: SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA., 2011. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?search=deteccion+deHLB>.

SENASICA 2013 Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?search=deteccion+deHLB>

SIAP. 2013. Producción agrícola por cultivo y por estado. México. [En línea]. Disponible en http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350<http://anrcatalog.ucdavis.edu/>.

Silva JP, Crotti ARM, Cunha WR. 2007. Antifeedant and allelopathic activities of the hydroalcoholic extract obtained from neem (*Azadirachta indica*) leaves. Revista Brasileira de Farmacognosia 17:529-532.

- Simon C, Frati F, Beckenback A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and a compilation of conserved PCR primers. *Annals. Entomol. Soc.* 87: 651-701.
- Sohail A, Nisar A, Rasool KR. 2004. Studies on population dynamics and chemical control of citrus psylla, *Diaphorina citri*. *International Journal of Agricultura and Biology* 6:970-973.
- Soler AJ, Soler GF. 2006. *Cítricos variedades y técnicas de cultivo*. Mundi-Prensa libros Madrid 52 pp.
- Sutherland JP, Baharally V, Permaul D. 2002. Use of the botanical insecticide, neem to control the small rice stinkbug *Oebalus poecilus* (Hemiptera: Pentatomidae) in Guayana. *Revista Internacional para el Estudio de la Entomologia Tropical* 17 (1): 97-101
- Texeira DC, Saillard C, Eveillard S, Danet JL, Ayres AJ, Bové JM. 2005. A new Liberibacter species, *Candidatus Liberibacter americanus* sp. Nov., is associated with citrus Huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil. *Preoceedings of 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, Calif. 325-340.
- Texeira DC, Saillard C, Couture C, Martins EC, Wulff NA, Jagoueix SE, Yamamoto PT, Ayres AJ, Bové JM. 2008. Distribution and quantification of C.M. *americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in San Paulo, State, Brasil in leaves of an affected sweet range tree as determined by PCR. *Molecular and Cellular Probes* 22:139-150

- Tsagkarakis AE, Rogers ME. 2010. Suitability of “Cleopatra” mandarin as a host plant for *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae). Florida Entomologist 93 (3): 451-453.
- Tsai JH, Wang JJ, Liu H. 2002. Seasonal abundance of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Southern Florida. Florida Entomologist 85(3): 446-451.
- Traboulsi AF, Taoubik HS, Bessiere JM, Rammal S. 2002. Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipens molestus* (Diptera: Culicidae). Pesticides Management Science 58:491-495.
- Vigueras A, Portillo L, Wagner B, Taveras R, Perez G. 2006. Uso de bioinsecticidas para el control de *Cactoblastis cactorun* Berg. Aprovechamiento integral de la Tuna. Argentina. (10) 4-8.
- Wandscheer CB, Duque JE, Dasilva M, Fukuyama Y, Wohlkw JL, Adelman J, Fontana JD. 2004. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. Toxicon 44: 829-835.
- Wilson I. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl Environ Microbiol. 63: 3741-3751