

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CONTROL DE *Diaphorina citri* MEDIANTE METODOLOGÍAS
ECO-COMPATIBLES**

por

María Eugenia AMORÓS MARTÍNEZ

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magíster en Ciencias Agrarias, opción
Ciencias Vegetales

**MONTEVIDEO
URUGUAY
Julio 2017**

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. Beatriz Scatoni, Ing. Agr. Dra. Gabriela Asplanato, Ing. Agr. PhD. Valentina Mujica y el Ing. Agr. Msc. Gerardo Gastaminza, el 12 de Julio de 2017. Autora: Qca. María Eugenia Amorós. Directora Q.F. PhD. Carmen Rossini, Co-director Ing. Agr. PhD. Fernando Rivas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Virginia Pereira das Neves, Verónica Galván, Abel Rodríguez y Juan Amaral por todo el esfuerzo y por hacer posible este trabajo.

A Carmen Rossini, José Buenahora y Fernando Rivas por confiar en mí, por su dedicación y por darme la oportunidad de trabajar con ustedes.

A los Lequers: Meri, Fede, Guille, Diana, Hernán, Anni, Paula, Lucía y Andrés, por los valiosos aportes a este trabajo, el cariño y las buenas vibras.

Al Sr. Alberto De Souza por permitirnos trabajar en su predio.

A Xavier Martini y Lukasz Stelinski por recibirme en la Universidad de Florida.

A Gastón Ares, Álvaro Otero y Jorge Franco por la ayuda en el análisis de los datos.

A la Estación Experimental INIA Salto Grande del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, al Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química y al Laboratorio de Entomología y Ecología Química aplicada de la Universidad de Florida, EEUU, en cuyas instalaciones se desarrollaron los ensayos de la presente tesis.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por financiar las becas de Maestría y Movilidad.

A mi tía Elena, Toe, Lua y Floren por alojarme todos esos días lejos de casa.

A Edgardo Disegna, Andrés Coniberti y Eduardo Dellacassa por abrirme las puertas al mundo de la Agronomía.

A Agus y a mis viejos.

TABLA DE CONTENIDO

	página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	VI
SUMMARY	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. <i>Diaphorina citri</i>	2
1.1.1 <u>Descripción</u>	2
1.1.2. <u>Aspectos bioecológicos</u>	3
1.1.3. <u>Daños e importancia económica</u>	5
1.2 MANEJO INTEGRADO DE <i>D. citri</i>	7
1.2.1. <u>Monitoreo</u>	7
1.2.2. <u>Control biológico</u>	9
1.2.3. <u>Control químico</u>	10
1.2.4. <u>Insecticidas botánicos, anti-alimentarios, repelentes y</u> <u>atravesantes</u>	11
1.3. SITUACIÓN EN URUGUAY	12
<u>2. SELECCIÓN DE INSECTICIDAS BIO-RACIONALES PARA EL</u> <u>CONTROL QUÍMICO DE <i>Diaphorina citri</i> (HEMIPTERA: LIVIIDAE) EN</u> <u>URUGUAY</u>	14
2.1. RESUMEN	14
2.2. SUMMARY	15
2.3. INTRODUCCIÓN	16
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
2.4.1. <u>Evaluación de actividad insecticida</u>	20
2.4.1.1. Evaluación de actividad insecticida en condiciones semi-controladas	20
2.4.1.2. Evaluación de actividad insecticida a campo en pequeña escala	21

2.4.2. <u>Evaluación de actividad anti-alimentaria</u>	22
2.4.3. <u>Evaluación de actividad repelente</u>	24
2.5. RESULTADOS	25
2.5.1. <u>Evaluación de actividad insecticida</u>	25
2.5.2. <u>Evaluación de actividad anti-alimentaria</u>	27
2.5.3. <u>Evaluación de actividad repelente</u>	29
2.6. DISCUSIÓN	30
2.7. CONCLUSIONES	33
2.8. BIBLIOGRAFÍA	34
3. <u>DESARROLLO DE POTENCIALES ATRAYENTES DE ADULTOS DE</u>	
<u>Diaphorina citri (HEMIPTERA: LIVIIDAE)</u>	38
3.1. RESUMEN	38
3.2. SUMMARY	39
3.3. INTRODUCCIÓN	40
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS	42
3.4.1. <u>Colecta y análisis de volátiles</u>	42
3.4.2. <u>Preparación de atrayentes sintéticos</u>	43
3.4.3. <u>Evaluación de atrayentes</u>	45
3.5. RESULTADOS	47
3.5.1. <u>Colecta y análisis de volátiles</u>	47
3.5.2. <u>Evaluación de atrayentes</u>	50
3.6. DISCUSIÓN	52
3.7. CONCLUSIONES	55
3.8. BIBLIOGRAFÍA	56
3.9. ANEXO	60
4. <u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	64
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	65

RESUMEN

El huanglongbing (HLB) es la enfermedad más destructiva de los cítricos a nivel mundial, causada por el complejo de bacterias asociadas al floema ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp. Su vector, el psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri*, Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), es considerado la plaga citrícola más importante y su control es un componente crítico para el manejo de la enfermedad. La detección del HLB en la región y la presencia del vector en el país representan una severa amenaza, por lo que tener un plan de manejo del vector permite estar en una posición ventajosa ante el ingreso del HLB al país. El objetivo de este trabajo fue generar herramientas aplicables a un manejo integrado de *D. citri*, en las condiciones agroecológicas del Uruguay. Para esto se evaluó la actividad insecticida, anti-alimentaria y repelente de diferentes principios activos (de recomendación internacional) en a ninfas y adultos de *D. citri*. Se determinó que en particular los aceites minerales, aceites vegetales y la abamectina resultan excelentes alternativas para el control de *D. citri*, así como también mostraron buenos resultados el spirotetramat y derivados de neem. A su vez se desarrollaron potenciales atrayentes para utilizarse junto con trampas amarillas de monitoreo. Para esto se determinó el perfil de volátiles emitido por 6 especies cítricas, incluido un hospedero óptimo (pomelo Duncan). A partir del mismo se preparó una mezcla sintética que fue evaluada junto a sus compuestos mayoritarios (limoneno y metil antranilato de metilo). Se observó que los perfiles de las especies reportadas como preferidas fueron similares, y que tanto la mezcla sintética diluida, como limoneno aumentaron la atracción de las trampas amarillas.

Palabras clave: Psílido asiático de los cítricos, manejo integrado de plagas, Uruguay.

Diaphorina citri CONTROL USING ECO-COMPATIBLE METHODOLOGIES

SUMMARY

Huanglongbing (HLB) is the most destructive citrus disease worldwide, caused by the phloem-associated bacteria complex '*Candidatus Liberibacter*' spp. Its vector, the Asian psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), is currently considered the most important citrus pest and its control is a critical component of HLB management. The detection of the disease in the region and the presence of the vector in Uruguay represents a severe threat, hence having a managing program for this insect allows to be in an advantageous position against the incoming of HLB to the country. The objective of this work was to generate integrated pest management tools for this insect, in Uruguayan agro-ecological conditions. For this purpose, insecticidal, antifeedant and repellent activity of different active ingredients (internationally recommended) was tested against *D. citri* immature stages and adults. Results proved mineral oils and vegetable oils in particular, as well as abamectin are excellent alternatives for controlling *D. citri* in local conditions. Spirotetramat and neem derivatives also showed good performances. Also, potential attractants to be used together with yellow sticky traps were developed. Volatile collections of 6 citrus species, including an optimum host (pomelo Duncan), were performed. Based on pomelo profile, a synthetic blend was prepared which was tested, as well as its main compounds (limonene and methyl N-methylantranilate) and different concentrations, together with yellow sticky traps against *D. citri* adults. It was observed that as the pomelo blend as limonene enhanced the yellow sticky traps catches.

Keywords: Asian citrus psyllid, integrated pest management, Uruguay.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la enfermedad más destructiva de los cítricos en el mundo es el huanglongbing (HLB), la enfermedad de los brotes amarillos. Su agente causal es el complejo de bacterias asociadas al floema ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp. El psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), es una de las plagas más importantes de los cítricos por su rol como vector de las bacterias antes mencionadas (Bové, 2006).

El daño causado por el HLB es considerable, las pérdidas son tanto cuantitativas como cualitativas, los árboles enfermos presentan decaimiento, el rendimiento disminuye y la calidad de la fruta se ve seriamente afectada. Los síntomas se intensifican a medida que la enfermedad progresa y los árboles pueden llegar a morir en un período de 5 años (Quarles, 2013). El HLB está siendo devastador para la industria citrícola a nivel mundial, con la destrucción hasta el momento de aproximadamente 100 millones de árboles de cítricos en 40 países, poniendo bajo amenaza la sostenibilidad de la industria citrícola (Boina y Bloomquist, 2015). La situación se ve agravada por el hecho de que en la actualidad no se ha encontrado cura para esta enfermedad (Singerman y Useche, 2016).

Tanto *D. citri* como ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp. son originarios de Asia, y se expandieron a numerosas regiones citrícolas en el mundo; en América *D. citri* fue reportada por primera vez en Brasil en la década de 1940 y posteriormente en Florida en 1998 (Abdullah et al., 2009; Halbert y Manjunath, 2004). El primer reporte de HLB ocurrió en 2004 en Brasil, 60 años después del primer reporte de presencia de *D. citri* en este país, y un año después en EEUU (Caletta-Filho et al., 2004; Halbert, 2005). Desde entonces el HLB se ha diseminado vertiginosamente a la mayoría de las regiones productoras de cítricos de EEUU, México, Belize, Costa Rica y gran parte del Caribe y América del Sur (Grafton-Cardwell et al., 2013). La rápida dispersión en plantaciones comerciales y residenciales se da tanto a través del transporte natural por el psílido como por el hombre mediante material vegetal infectado (Halbert y Manjunath, 2004).

El control de la enfermedad a nivel mundial se sostiene en tres componentes: a) utilización de material vegetal saneado, b) erradicación de plantas infectadas para eliminar el inóculo y c) el control de las poblaciones de *D. citri* para limitar la dispersión de la enfermedad. La dificultad de detectar tempranamente el HLB, conjuntamente a su rápida diseminación, hizo que los esfuerzos alrededor del mundo se concentraran en el control de las poblaciones del vector (Grafton-Cardwell et al., 2013).

1.1 *Diaphorina citri*

1.1.1 Descripción

Los psílidos (Hemiptera, Psylloidea) constituyen un pequeño grupo de insectos esternorrincos caracterizados por un alto grado de especificidad de hospedero. A esta superfamilia pertenecen varias plagas de importancia agrícola (Burckhardt, 1994). Las especies pertenecientes a esta superfamilia se caracterizan por ser insectos pequeños, con antenas compuestas generalmente por 10 segmentos (dos basales más robustos y los restantes más o menos alargados). Las patas posteriores son saltadoras con tarsos dímeros. Presentan cuatro alas membranosas, generalmente hialinas, las anteriores pueden presentar manchas más o menos extensas. A pesar de que machos y hembras son aparentemente semejantes, es fácil reconocerlos por el aspecto de sus respectivas gonapófises; en las hembras es puntiaguda y curvada hacia atrás, mientras que en los machos el ápice está doblado hacia arriba (Costa Lima, 1942). Las especies de *Diaphorina* usualmente se distinguen en base al patrón de venación alar y en la forma de los conos genales (Halbert y Manjunath, 2004). *Diaphorina citri* [= *Euphalarus citri* (Kuwayama 1908)] fue descrita en Shinchiku, Taiwan en 1907, asociada a cítricos.

Se han reportado una amplia gama de hospederos dentro de las rutáceas, principalmente dentro de los géneros *Citrus* y *Murraya* (Halbert y Manjunath, 2004). La reproducción, el desarrollo y la supervivencia del insecto pueden variar en los distintos hospederos (Alves et al., 2014; Liu y Tsai, 2000), siendo la disponibilidad de brotes tiernos

el factor principal asociado a los aumentos poblacionales debido a que el psílido presenta alta asociación con los tejidos en crecimiento, tanto en la etapa de oviposición como durante el desarrollo ninfal (Nava et al., 2007).

1.1.2 Aspectos bioecológicos

Los adultos de *D. citri* (Figura 1) son insectos pequeños y de hábitos bastante sedentarios. El tamaño de la hembra es de aproximadamente 3 mm de largo y 1 mm de ancho siendo los machos algo más pequeños. En reposo se encuentran mayormente en el envés de las hojas y cuando son perturbados saltan y realizan vuelos cortos. Presentan el cuerpo de color marrón moteado cubiertos de secreciones cerosas. La cabeza es de color castaño con ojos rojos y antenas con el ápice negro. Las alas más anchas en su tercio apical presentan manchas marrones a lo largo de sus bordes. El abdomen presenta diferentes coloraciones: gris-amarronado, azul-verdoso y amarillo-anaranjado. Los adultos se posan en las plantas de una forma característica formando un ángulo de 45° (Figura 1). Se alimentan sobre tallos tiernos y hojas en todos sus estados de desarrollo (Asplanato et al., 2011).

Las hembras de *D. citri* son prolíficas pudiendo poner hasta 800 huevos en su vida, los cuales son depositados solamente en tejido joven, principalmente en brotes tiernos de menos de 5 días (Halbert y Manjunath, 2004). Los huevos eclosionan luego de 2 a 4 días, y tienen 5 estadios ninfales. El adulto emerge generalmente luego de 11 a 15 días. El ciclo de vida completo varía típicamente entre 15 y 47 días dependiendo de la temperatura y la planta hospedera (Liu y Tsai, 2000). Durante el invierno, debido a la ausencia de brotación del árbol, solo se encuentran adultos hibernantes que salen de la diapausa reproductiva con el aumento de la temperatura en primavera y la nueva brotación asociada (Monzó et al., 2014b). Los huevos son ovalados (Figura 2A), de 0,3 mm de longitud y 0,14 mm de ancho. Recién puestos presentan una coloración amarilla tornándose anaranjados próximo a la eclosión. El primer estadio ninfal mide 0,3 mm de largo y 0,17 de ancho, rosado y se destacan los ojos rojos. En el segundo estadio se comienzan a observar los rudimentos

alares. En el tercer estadio se comienza a evidenciar la segmentación antenal. Las ninfas totalmente desarrolladas de 5° estadio miden 1,6 mm de largo y 1 mm de ancho (Figura 2B-F) (Asplanato et al., 2011).

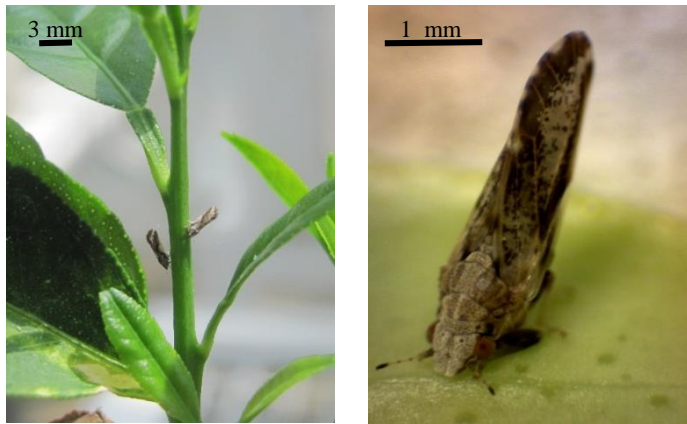


Figura 1. Adultos de *Diaphorina citri* en su pose característica a 45°. Fotografías: Verónica Galván (INIA Salto Grande).

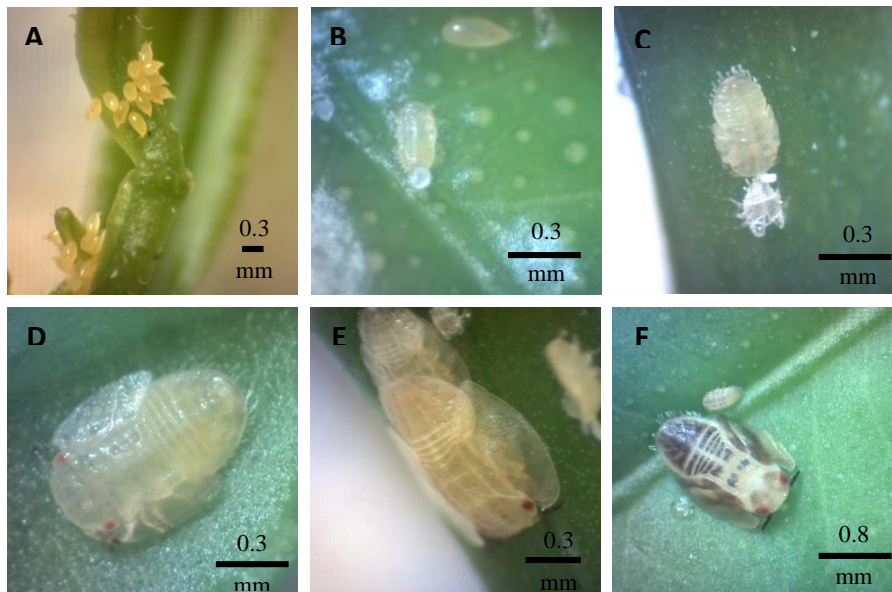


Figura 2. Estadios de desarrollo de *Diaphorina citri*, huevos (A) y ninfas del 1° al 5° estadio (B-F). Fotografías: Verónica Galván (INIA Salto Grande).

1.1.3 Daños e importancia económica

Diaphorina citri causa daños directos e indirectos a los árboles cítricos. Los daños directos están asociados a altas densidades y son debidos a la succión de savia del floema por parte de adultos y ninfas, así como a la inyección de toxinas que se encuentren en la saliva. Los mayores perjuicios son debidos a los daños indirectos, por ser vector del complejo de bacterias asociadas al floema ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp., agente causal del HLB (Grafton-Cardwell et al., 2013; Halbert y Manjunath, 2004). Este complejo está constituido por ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ el cual fue reportado solo en Brasil y ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’ que no está presente en América. *Diaphorina citri* es capaz de vectorizar los 3 patógenos; tanto las ninfas de 4° y 5° estadio como los adultos son capaces de transmitir la enfermedad, pero son los adultos, debido a su movilidad, los mayores contribuyentes a la propagación (Grafton-Cardwell et al., 2013).

El HLB es la peor enfermedad de citrus causada por un patógeno vectorizado. Todas las especies de cítricos comerciales son susceptibles y no existen hasta el momento variedades tolerantes. El comienzo de la enfermedad ocurre luego de un largo período de latencia post-inoculación, por lo que el patógeno puede ser diseminado ampliamente previamente ser detectado. La dinámica, epidemiología y características moleculares del complejo son poco comprendidas siendo que las bacterias hasta el momento no han podido ser cultivadas *in vitro* (Halbert y Manjunath, 2004). ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp. actúa por disrupción del floema, pudiendo inducir la enfermedad por bloqueo físico del transporte de metabolitos (Kim et al., 2009). Aberraciones anatómicas en el hospedero, como floema necrótico, acumulación masiva de almidón y cambium trastornado se han observado como síntomas en plantas infectadas con HLB (Kim et al., 2009).

Los árboles infectados exhiben decaimiento y se vuelven improductivos (30–100% reducción en rendimiento), lo que puede llevar a que un huerto sea económicamente inviable a los 7-10 años después de su implantación (Gottwald et al., 2007). Los principales síntomas en árboles incluyen hojas cloróticas, ramas secas y caída de fruta

(Figura 3) (Bové, 2006; Gottwald et al., 2007). Los síntomas se intensifican a medida que la enfermedad progresa y los árboles mueren en un período de 3 a 5 años (Quarles, 2013). La fruta afectada es más pequeña y liviana, asimétrica, muy ácida, con una reducción de grados Brix, sólidos solubles y porcentaje de jugo (Gottwald et al., 2007).

En Brasil, actualmente el mayor productor mundial de cítricos (USDA, 2017), 42.5 millones de plantas, de 197 millones en total, han sido eliminadas en los últimos 12 años. En este país es obligatoria la eliminación de todos los árboles del huerto cuando la infección alcanza el 28% del mismo; intentando minimizar la dispersión del patógeno (Boina y Bloomquist, 2015). En Florida, el mayor Estado productor de cítricos de EEUU y tercer productor mundial, la enfermedad se declaró endémica (Gottwald y Dixon, 2006), y se estima que el 99% de los árboles cítricos del Estado están infectados con HLB. Desde el 2005 el HLB ha causado una reducción del rendimiento del 42 %, con una producción de 242 millones a 104.6 millones de cajas en 2014 (Singerman y Useche, 2016). Estos datos muestran cómo la sostenibilidad de la industria citrícola está amenazada severamente a nivel mundial.



Figura 3. Síntomas característicos del HLB. Frutos pequeños y asimétricos (A), y hojas cloróticas con moteado asimétrico característico (B). Fotografías: Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, EEUU.

1.2 MANEJO INTEGRADO DE *D. citri*

Los frutales de hoja perenne, como los cítricos, proveen un ecosistema estable y complejo que permite que en ellos habite una gran biodiversidad de insectos (Pereira da Silva Canettieri y Garcia, 2000). Los organismos benéficos son muy abundantes en el agroecosistema citrícola y su preservación es un factor a considerar en el manejo de plagas del cultivo, dado que los mismos regulan naturalmente las poblaciones de muchos insectos y ácaros fitófagos (Asplanato, 2009). Por esta razón es de extrema relevancia que el control de plagas en citricultura se enmarque necesariamente en un plan de manejo integrado de plagas (MIP). El MIP se ha definido como un enfoque del control de plagas que utiliza medidas combinadas para reducir la población de las plagas a niveles tolerables manteniendo la calidad del ambiente (Pedigo, 1989). Éstos programas utilizan métodos de monitoreo de las poblaciones, aplicaciones de plaguicidas selectivos para asegurar el mantenimiento de la efectividad de los enemigos naturales, los cuales juegan un papel sustancial en la regulación de las poblaciones de *D. citri* (Yamamoto, 2008). El objetivo de este tipo de manejo es reducir el número de aplicaciones de plaguicidas minimizando así los costos ecológicos y el impacto sobre la fauna benéfica (Rogers et al., 2009).

1.2.1 Monitoreo

El monitoreo es una herramienta fundamental en los planes de manejo integrado. Las medidas de control requieren información precisa de la presencia, dispersión, comienzo de oviposición y densidad de poblaciones (Horton, 1999). Esta herramienta permite poder realizar intervenciones a tiempo y solo cuando son realmente necesarias (Boina y Bloomquist, 2015).

Para un manejo eficiente de *D. citri* es esencial disponer de métodos de muestreos que sean fáciles de implementar y a su vez suministren información de confianza sobre las fluctuaciones espacio-temporales de las poblaciones del psílido.

Un método de monitoreo utilizado ampliamente para monitorear adultos de *D. citri* es el método de golpeo de rama. Éste se realiza utilizando un trozo de tubería de pvc de unos 30 cm de longitud, golpeando la rama vigorosamente 2 o 3 veces; con éste método, los adultos que están en las hojas y brotes de la rama caen sobre una tablilla de color blanca que se coloca bajo la rama (Figura 4 A). También son utilizadas para el monitoreo de adultos las trampas amarillas pegajosas (Figura 4 B). Otros métodos de monitoreo incluyen conteos visuales sobre rama e inspección de brotes (Monzó et al., 2014a) los únicos capaces de detectar huevos y estadios inmaduros (Miranda et al., 2017).

La eficiencia y eficacia de los distintos métodos de monitoreo es debatida y es altamente dependiente de la densidad poblacional. Cuando las poblaciones son altas todos los métodos son capaces de detectar la presencia y monitorear las fluctuaciones de *D. citri* y las capturas correlacionan positivamente (Amuedo, 2010; Miranda et al., 2017); mientras que cuando las poblaciones son bajas los resultados de distintos autores son variables. Miranda et al. (2017) reportaron que en estas condiciones el método de inspección visual no es capaz de detectar al psílido, y que las trampas amarillas fueron el único método capaz de detectarlos. Godfrey et al. (2013) reportan contrariamente que las mismas no serían confiables cuando las poblaciones son bajas. Resultados de trabajos nacionales, donde las poblaciones son bajas y agregadas (Asplanato et al., 2011), coinciden con este último autor, observando que el método del golpeo en todos los casos presenta mayores capturas (Amuedo, 2010; Buenahora et al., 2016). Se ha observado que las trampas amarillas capturarían más adultos cuando la brotación está desarrollada, probablemente debido a que el insecto podría estar más activo, buscando brotes aptos para oviponer; y que cuando predominan brotes tiernos las capturas en las mismas descienden. A su vez durante los períodos de baja disponibilidad de brotes jóvenes los psílicos adultos pueden migrar a nuevas áreas donde existan brotes nuevos para realizar las posturas y este es uno de los movimientos que las trampas amarillas pueden detectar (Buenahora et al., 2016). Estos resultados son esperables ya que las trampas amarillas están afectadas por la densidad de las poblaciones y componentes comportamentales (Horton, 1999). Diversos factores bióticos y abióticos que influyen la capacidad de vuelo del insecto,

como la temperatura, clima, momento del año, sexo, edad o estatus reproductivo, tendrán un efecto sobre las capturas de las trampas pegajosas, como fue reportado para *Cacopsylla pyricola* (Foerster) (Hemiptera: Psyllidae) (Horton, 1999).



Figura 4. Métodos comunes de monitoreo de *D. citri*: Golpeo de ramas (A) y trampas amarillas (B). Fotografías: Verónica Galván (INIA Salto Grande).

1.2.2 Control biológico

Para cualquier implementación de MIP en el cultivo es fundamental considerar la acción de los enemigos naturales, minimizando el uso de insecticidas. Se han citado varias especies de parasitoides, predadores y entomopatógenos como enemigos naturales de *D. citri* que pueden colaborar en la disminución de las poblaciones del psílido (Grafton-Cardwell et al., 2013).

En particular *Tamarixia radiata* (Waterston) (Eulophidae), ectoparasitoide eficiente de ninfas de *D. citri*, del cual no se conoce otro psílido hospedero aparte de *D. citri* (Skellely y Hoy, 2004), se reporta como su parasitoide primario. Son excelentes buscadores y se instalan y esparcen con facilidad (Mann et al., 2010). Una sola hembra de

T. radiata puede eliminar hasta 500 *D. citri* durante su vida (Skelley y Hoy, 2004). Las hembras colocan 1 huevo por ninfa (en ninfas del 4° y 5° estadio), la larva emerge y se alimenta de la hemolinfa del hospedero que eventualmente muere (Pluke et al., 2008). *T. radiata* ha sido utilizado en programas de control biológico clásico, reduciendo de forma significativa las poblaciones de *D. citri* en diferentes regiones del mundo como la Isla Reunión y Taiwan (Skelley y Hoy, 2004). En Uruguay *T. radiata* ha sido reportada, pero naturalmente las densidades poblacionales resultan ser muy bajas (Asplanato et al., 2011).

A su vez se debe remarcar la importancia de otras fuentes de control biológico. Los principales predadores conocidos del psílido son coccinélidos, crisópidos, sírfidos y arañas. Resultados nacionales de relevamientos de predadores en montes cítricos comerciales mostraron la presencia de los coccinélidos *Harmonia axyridis*, *Cycloneda sanguinea*, *Curinus coeruleus*, *Scymnus demerarensis*, *Rodolia cardinalis*, *Cryptolaemus mountrouzieri*, *Chilocorus bipustulatus* y otras especies *Coccinellidae spp* aún no identificadas. Asimismo se colectaron los crisópidos *Chrysoperla externa*, *Ceraeochrysa cinta* y una especie del género *Leucochrysa*. *Cr. mountrouzieri*, *S. demerarensis* y *Lucochrysa sp* (Pechi et al., 2016).

También una variedad de hongos entomopatógenos se han reportado capaces de infectar a *D. citri*, en especial en condiciones de alta humedad. Estos incluyen *Isaria (Paecilomyces) fumosorosea* (Wize), *Lecanicillium lecanii* R. Zare & W Gams (164), *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., y *Hirsutella citriformis* Speare (citado por (Grafton-Cardwell et al., 2013).

1.2.3 Control químico

Dado que *D. citri* presenta estrecha asociación con los tejidos en crecimiento y un corto y prolífero ciclo biológico, resulta un insecto de difícil control, por lo que las poblaciones deben ser mantenidas tan bajas como sea posible.

Mundialmente esto ha llevado tanto al incremento del uso de insecticidas de diferentes grupos químicos, como del número de aplicaciones que pueden llegar a 21 aplicaciones al año, con costos anuales por hectárea que pueden variar entre 240 y 1000 USD dependiendo del insecticida, frecuencia y método de aplicación (Boina y Bloomquist, 2015).

Se recomienda el diseño de calendarios bio-rationales con aplicaciones foliares durante el período de brotación, dirigidas a estadios inmaduros, y rotando los modos de acción de los productos usados para evitar la generación de resistencia, así como aplicaciones de bajo volumen con aceites parafínicos (Grafton-Cardwell et al., 2013). Sin embargo, en las regiones donde el HLB está presente, el control químico a campo se basa principalmente en aplicaciones foliares mensuales de insecticidas de amplio espectro y otros insecticidas de menor impacto. Para la gestión de plantaciones jóvenes que presentan abundante brotación, se recomiendan aplicaciones al suelo o tronco de neonicotinoides sistémicos (Monzó et al., 2014b). También se recomiendan aplicaciones invernales, que coinciden con los períodos de eco-dormición, con productos de amplio espectro, como pueden ser piretroides, organofosforados o carbamatos, dirigida a los adultos hibernantes, que no se reproducen y están expuestos en el follaje, reduciendo así las poblaciones de las primeras generaciones asociadas a la nueva brotación de primavera y por ende las posturas (Qureshi y Stansly, 2010). Cabe destacar que estos principios activos generalmente actúan a nivel del sistema nervioso central del insecto (Boina y Bloomquist, 2015) afectando indiscriminadamente a todos los órdenes de insectos, incluyendo la fauna benéfica. A su vez algunos de estos productos son muy persistentes y nocivos, por lo que muchos de ellos han sido prohibidos o restringidos.

El uso masivo de insecticidas de amplio espectro resulta insostenible a largo plazo, causando desarrollo de resistencia de la plaga y consecuencias negativas para el medio ambiente y los enemigos naturales locales o introducidos (Mann et al., 2012a). En Florida (EEUU) ya se ha reportado resistencia del psílido a neonicotinoides, piretroides y organofosforados y este tipo de manejos no ha resultado ser eficiente en la disminución de la dispersión del HLB (Tansey et al., 2015).

1.2.4 Insecticidas botánicos, anti-alimentarios, repelentes y atrayentes

Estrategias de manejo novedosas como la utilización de insecticidas botánicos, semioquímicos como atrayentes, repelentes y anti-alimentarios pueden ser alternativas o complementos útiles a los insecticidas de síntesis para un programa de MIP (Mann et al., 2011). Muchos estudios recientes comprueban la influencia de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) sobre el comportamiento de herbívoros, donde los compuestos emitidos por las plantas son capaces de atraerlos o repelerlos (Correa Signoretti, 2014). Antialimentarios como por ejemplo neonicotinoides y pymetrozine pueden inhibir la alimentación de los insectos picosuctores, reduciendo así la transmisión de las enfermedades asociadas (Boina et al., 2011; Boina et al., 2009). Efectos sub-letales de neonicotinoides y reguladores de crecimiento pueden disminuir la fertilidad y/o producción de huevos y desarrollo de los mismos (Boina et al., 2010). Repelentes como derivados de plantas y aceites minerales se han estudiado como deterrentes de la oviposición y alimentación (Mann et al., 2011; Onagbola et al., 2011; Ouyan et al., 2013; Zaka et al., 2010). Repelentes físicos como films particulados también se han reportado como posibles alternativas (Hall et al., 2007). Algunos de estos productos se han reportado como muy efectivos en laboratorio y campo. Estos productos podrían ser utilizados como componentes de un gran programa de manejo integrado para ayudar a reducir la dispersión de la enfermedad, sin embargo el desarrollo de estas estrategias para su uso práctico sigue en progreso (Grafton-Cardwell et al., 2013).

1.3 SITUACIÓN EN URUGUAY

La citricultura uruguaya está constituida por 438 empresas de las que más del 90% son pequeños y medianos productores, y ocupa una superficie efectiva de 15101 ha, con más de 7 millones de plantas. Los cítricos en Uruguay encabezan la lista de exportaciones de frutas, siendo el 42% de la producción de fruta fresca destinado a este propósito, con un ingreso de aproximadamente 85 millones de dólares en 2015 (MGAP-DIEA, 2016).

Nuestro principal mercado es la Unión Europea y en 2013 se ha logrado ampliar las fronteras de la comercialización al mercado de los EEUU. La calidad de fruta para exportación es un factor muy importante ya que establece el acceso a los mercados importadores y su valor comercial. A su vez estos mercados exigen fruta con niveles de residuos nulos o muy bajos y los principios activos posibles de utilizar son muy pocos.

El HLB se reportó en América del Sur por primera vez en Brasil en 2004, en el Estado de San Pablo, actualmente también se encuentra en el Estado de Minas Gerais y Paraná. En 2012 en Argentina se confirmó la presencia de HLB en la provincia de Misiones (Outi et al., 2014), actualmente se ha detectado también en Corrientes, Chaco y Formosa (SENASA, 2017). En Paraguay se detectó en 2008 la presencia de *D. citri* y posteriormente se encontraron focos positivos de HLB (SENAVE, 2017). Uruguay se encuentra hasta el momento en una situación excepcional con la presencia del vector, reportado por primera vez en 1991 (Bernal, 1991) y sin reportes de presencia de la enfermedad hasta el momento. Sin embargo la detección de la enfermedad en la región y la presencia del vector en el Uruguay representan una severa amenaza para su citricultura, donde el ingreso del HLB parece ser un hecho inminente. Esta situación debe ser tomada como una oportunidad para desarrollar y poner en práctica rápidamente estrategias de control de las poblaciones de este insecto, enmarcadas necesariamente en un programa MIP, apuntando a una citricultura sostenible y respetuosa con los enemigos naturales y medio ambiente (Asplanato et al., 2011).

2. SELECCIÓN DE INSECTICIDAS BIO-RACIONALES PARA EL CONTROL QUÍMICO DE *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: LIVIIDAE) EN URUGUAY¹

2.1 RESUMEN

El huanglongbing (HLB) es la enfermedad más destructiva de los cítricos a nivel mundial, causada por las bacterias asociadas al floema ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp. Su vector, el psílido asiático *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), es considerado la plaga citrícola más importante en la actualidad. La detección de la enfermedad en la región y la presencia del vector en el Uruguay representan una severa amenaza. El control de las poblaciones de *D. citri* es un componente crítico para el control de la enfermedad, por lo que tener un plan de manejo de este insecto permite estar en una posición ventajosa ante el ingreso del HLB al país. El objetivo de este trabajo fue evaluar una serie de productos de bajo impacto, candidatos a ser incluidos en un manejo integrado de *D. citri* en las condiciones agroecológicas del Uruguay. Para esto se seleccionaron diferentes principios activos de recomendación internacional a los que se ensayó su actividad insecticida, en condiciones semi-controladas y a campo, en el corto plazo en estadios inmaduros del psílido. Se evaluó también la actividad anti-alimentaria de estos productos y actividad repelente de aceites en adultos de *D. citri*. Con estos ensayos se determinó que en particular los aceites minerales, aceites vegetales y la abamectina resultan excelentes alternativas para el control de *D. citri* en condiciones locales, así como también mostraron buenos resultados el spirotetramat y los derivados de neem.

Palabras clave: Psílido asiático de los cítricos, control químico, manejo integrado de plagas, Uruguay.

¹ Este artículo fue escrito de acuerdo a las normas para autores de Agrocienza Uruguay.

SELECTION OF BIO-RATIONAL INSECTICIDES FOR *Diaphorina citri*
(HEMIPTERA: LIVIIDAE) CONTROL IN URUGUAY

2.2 SUMMARY

Huanglongbing (HLB) is the most destructive citrus disease worldwide, caused by the phloem-associated bacteria complex ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp. Its vector, the Asian psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), is currently considered the most important citrus pest. The detection of the disease in the region and the presence of the vector in Uruguay, represents a severe threat. Keeping *D. citri* populations as low as possible is a critical component of HLB management, hence having a managing program for this insect allows to be in an advantageous position against the incoming of HLB to the country. The objective of this research was to select of low impact products, candidates to be included in a management program for this insect in Uruguayan agro-ecological conditions. For this purpose, insecticidal activity of different active ingredients (internationally recommended) was tested, in controlled conditions and field trials, evaluating short term action against immature stages of the insect. Antifeedant activity of these products and repellent action of oils was also tested against adults of *D. citri*. Results proved mineral oils and vegetable oils in particular, as well as abamectin as excellent alternatives for controlling *D. citri* in local conditions, spirotetramat and neem derivatives also showed good performances.

Keywords: Asian citrus psyllid, chemical control, integrated pest management, Uruguay.

2.3 INTRODUCCIÓN

En la actualidad la enfermedad más devastadora de los cítricos en el mundo es el huanglongbing (HLB), causada por las bacterias asociadas al floema ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp. La evolución de los síntomas puede ser muy rápida, disminuyendo la producción y la calidad de la fruta, además de provocar la eventual muerte de los árboles afectados en un rango de 3 a 5 años (Bové, 2006). El psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama, Hemiptera: Liviidae (*D. citri*), es considerada la plaga más importante de los cítricos principalmente por su rol como eficiente vector de las bacterias antes mencionadas. La detección de la enfermedad en países limítrofes a pocos kilómetros de nuestra principal región citrícola, así como la presencia del vector en nuestro país presentan una severa amenaza para la citricultura en el Uruguay, dedicada principalmente a la exportación de fruta para consumo en fresco y con costos de producción muy ajustados, donde el impacto económico y social de la presencia del HLB podría ser devastador (MGAP-DIEA, 2016).

El control de la enfermedad a nivel mundial se sostiene en tres componentes: la utilización de plantas sanas, la erradicación de plantas infectadas para eliminar el inóculo y el control de las poblaciones del vector. La dificultad en la detección de estadios tempranos de la infección, y la rápida diseminación del HLB, han hecho que los esfuerzos alrededor del mundo se concentrasen en el control de las poblaciones del *D. citri* (Grafton-Cardwell et al., 2013). Dado que este insecto presenta estrecha asociación con los tejidos en crecimiento y un corto y prolífero ciclo biológico, su control resulta muy dificultoso, por lo que las poblaciones deben ser mantenidas tan bajas como sea posible. Mundialmente esto ha llevado tanto al incremento del uso de insecticidas de diferentes grupos químicos, como del número de aplicaciones (de 1 a 21 aplicaciones al año), con costos anuales por hectárea que pueden variar entre 240 y 1000 USD dependiendo del insecticida, frecuencia y método de aplicación (Boina y Bloomquist, 2015). El uso masivo de insecticidas de amplio espectro resulta insostenible a largo plazo, causando desarrollo de resistencia de la plaga y consecuencias negativas para el medio ambiente y los

enemigos naturales locales o introducidos (Mann et al., 2012a). Esto no resulta una alternativa viable para la citricultura en Uruguay, cuyo principal objetivo es la exportación de fruta para consumo en fresco, donde los mercados importadores exigen niveles de residuos en fruta nulos o muy bajos y los principios activos posibles de utilizar son muy pocos; a su vez sería inviable el aumento de costos asociado al aumento del número de intervenciones y el desbalance que esto implicaría en las poblaciones de enemigos naturales (Boina y Bloomquist, 2015). El control poblacional debe estar enmarcado entonces necesariamente en un programa de manejo integrado de plagas (Asplanato et al., 2011).

Tener un plan de manejo de las poblaciones del vector permite estar en una posición ventajosa ante el eventual ingreso del HLB al Uruguay, contribuyendo al fortalecimiento de su citricultura.

Con el objetivo de comenzar a delinear medidas efectivas y validadas en nuestras condiciones agroecológicas, este trabajo evaluó productos candidatos a ser incluidos en un manejo integrado de *D. citri* en las condiciones citrícolas del Uruguay. Para esto se seleccionaron principios activos (Cuadro 1) que han sido recomendados internacionalmente para el control de *D. citri* (Boina et al., 2010; Ouyan et al., 2013; Rogers et al., 2014; Sandoval-Rincón et al., 2010; Srinivasan et al., 2008; Weathersbee y McKenzie, 2005; Yamamoto et al., 2009), especialmente insecticidas de bajo impacto frente a enemigos naturales y el medio ambiente. Se evaluó la actividad insecticida de ninfas así como la actividad anti-alimentaria y repelente de adultos, con el fin de seleccionar productos que controlen, mediante múltiples modalidades, tanto a estadios inmaduros como maduros de la plaga.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los ensayos de laboratorio e invernadero se realizaron en la Estación Experimental INIA Salto Grande, en Salto, Uruguay. Se seleccionaron tanto insecticidas con registro para uso en cítricos como productos aún no registrados en nuestro país

(MGAP-DGSA, 2016) (Cuadro 1). Dentro de esta lista se encuentran distintos principios activos con diferente modo de acción, un surfactante siliconado así como diferentes marcas comerciales de aceites minerales y vegetales, ampliamente utilizados en el manejo fitosanitario en cítricos.

Cuadro 1. Productos seleccionados y actividades estudiadas.

Producto	Principio activo	Producto comercial	Actividad insecticida		Actividad anti-alimentaria	Actividad repelente
			Invernadero	Campo	Laboratorio	Invernadero
Abamectina	Abamectina 18 gL-1	Facily 18 EC	✓	✓	✓	NE**
Spirotetramat	Spirotetramat 150 gL-1	Movento 150 OD	✓	✓	✓	NE
Neem 10000*	Azadiractina 1.0% + aceite de neem 30.0%	Nico Neem	✓	✓	✓	NE
Neem 300	Azadiractina 0.03% + aceite de neem 90.57%	Neem Super	✓	✓	✓	NE
AS Prodinoleo	Aceite de Soja	Prodinoleo	✓	✓	✓	✓
AM Argenfrut	Aceite mineral	Argenfrut	✓	✓	✓	✓
AS Stoller	Aceite de Soja	Stoller	NE	✓	NE	NE
AM Elf	Aceite mineral	Elf	NE	✓	NE	NE
AM Pioneer	Aceite mineral	Pioneer	NE	✓	NE	NE
Silwet (SW)	Surfactante siliconado no iónico	Silwet L77	NE	✓	NE	NE

* Producto no registrado. ** NE: No ensayado.

2.4.1 Evaluación de actividad insecticida

Se realizó en primera instancia la evaluación de la eficiencia a corto plazo en estadios inmaduros del psílido en invernadero, lo que permitió conocer el potencial de los productos en condiciones semi-controladas; y a campo, donde se evaluaron en condiciones de producción.

Cuadro 2. Tratamientos en ensayos de actividad insecticida.

Tratamiento	%*	Invernadero	Campo	
			Ensayo 1	Ensayo 2
Abamectina	0.05	✓	✓	
Spirotetramat	0.075	✓	✓	
Neem 10000	0.5	✓	✓	
Neem 300	0.25	✓	✓	
AS Prodinoleo	1	✓	✓	✓
AM Argenfrut	1	✓	✓	✓
AM + SW	0.5 / 0.02			✓
SW	0.02			✓
AS Stoller	1			✓
AM Argenfrut 0.5	0.5			✓
AM Elf	1			✓
AM Pioneer	1			✓
testigo (agua)	...	✓	✓	✓

* Refiere a mL de producto/100 mL de agua.

2.4.1.1. Evaluación de actividad insecticida en condiciones semi-controladas

Se seleccionaron plantines de naranjo dulce (*Citrus sinensis*) de 6 meses de edad en macetas de 3 L (3 plantas por maceta), infectados con ninfas del 3° estadio (al menos 150 ninfas por tratamiento). Se aplicaron 6 tratamientos (Cuadro 2) y el testigo (agua). Se pulverizaron los plantines con pulverizadores manuales (PULMIC

RAPTOR 1, 1L), girando la planta 4 veces y realizando 3 disparos en cada una de las 4 posiciones, para producir finas gotas que cubrieran el follaje (10 mL por planta). Una vez seco el caldo, se colocaron 3 macetas (cada maceta 1 repetición) en jaulas de caños plásticos y malla blanca, de 46 cm x 46 cm de base y 56 cm de alto, cada jaula correspondiente a 1 tratamiento. Las jaulas se colocaron en un invernadero de vidrio a 23 ± 10 °C. Se realizó la evaluación a los 3 días de realizada la aplicación, retirando los brotes de los plantines y contando el total de ninfas vivas y muertas (inmóviles y deshidratadas) por brote bajo lupa estereoscópica (SZH10, Olympus).

Los resultados se analizaron mediante un Modelo Lineal Generalizado Mixto (procedimiento GLIMMIX), asumiendo distribución binomial para la variable proporción de insectos muertos en el total de insectos contados y una función de enlace Logit. Las medias se separaron por un test de Tukey-Kramer, mediante el procedimiento LS-means ($p < 0.05$).

2.4.1.2. Evaluación de actividad insecticida a campo en pequeña escala

Se realizaron 2 ensayos de evaluación de actividad insecticida a campo en estadios inmaduros del psílido (ensayo campo 1 y ensayo campo 2). Los ensayos se realizaron sobre un predio comercial sobre un cuadro de naranjas Navel cv. “Lane Late” de 3 años injertadas sobre *Poncirus trifoliata*, ubicado en la localidad de San Antonio, Salto (-31.38° , -57.75°). Los tratamientos de cada ensayo se detallan en el Cuadro 2.

Dada la distribución agregada de *D. citri* (Asplanato et al., 2011) se adaptó la metodología propuesta por Lizondo et al. (2014), en condiciones similares de baja densidad poblacional a campo. Las parcelas fueron conformadas por un número establecido, mayor o igual a 50 ninfas ninfas del 3° al 5° estadio, independientemente del número de árboles incluidos (dentro de la misma fila). Las ninfas debieron estar en un mínimo de 4 brotes. Se dejó una planta borde en cada extremo de las parcelas, y se utilizó una fila por medio.

Se realizaron las aplicaciones con mochila pulverizadora eléctrica (“Flopi”, 12 v, 16 L, Gianni), siendo el gasto de caldo de 1,9 L/planta. Luego de seco el caldo se

cubrieron los brotes con bolsas de voile suficientemente amplias como para mantenerlos ventilados (Figura 1). A los 4 días se extrajeron los brotes y se contó el total de ninfas vivas y muertas bajo lupa estereoscópica (SZH10, Olympus).

Se conformaron 3 bloques con parcelas al azar, una parcela correspondió a un tratamiento, cada bloque una repetición. A su vez cada ensayo se repitió en 2 fechas (ensayo campo 1 se realizó en febrero y abril del 2015; ensayo campo 2 se realizó en diciembre 2015 y diciembre 2016) conformando un total de 6 repeticiones por ensayo.

Los resultados se analizaron mediante un Modelo Lineal Generalizado Mixto (procedimiento GLIMMIX), asumiendo distribución binomial para la variable proporción de insectos muertos en el total de insectos contados y una función de enlace Logit. Las medias se separaron por un test de Tukey-Kramer, mediante el procedimiento LS-means ($p < 0.05$). Se incluyó el factor bloque y el factor fecha en el modelo.

2.4.2 Evaluación de actividad anti-alimentaria

Para la evaluación de actividad anti-alimentaria o estudio de la inhibición o reducción en la alimentación de adultos producida por la presencia del producto en la planta, se utilizó una técnica de evaluación indirecta, donde se contabilizan los deshechos de alimentación (mielecilla) (Boina et al., 2009).

Se realizaron 3 ensayos, los tratamientos se detallan en el Cuadro 3. En un primer ensayo (Ensayo 1) se evaluaron 3 productos con reportada capacidad de penetrar en la planta, con distintos mecanismos de acción: spirotetramat, abamectina y Neem 10000 (Cuadro 3). Para ello se sumergieron hojas tiernas de cítricos recién cortadas por 24 h en soluciones acuosas de los productos a testear y posteriormente se dejaron secar. En un segundo ensayo (Ensayo 2) se evaluaron 3 productos con actividad por contacto: un aceite de soja, un aceite mineral y Neem 300 (Cuadro 3), pulverizándose los plantines con emulsiones en agua de los productos a testear y una vez seco el caldo, se cortaron las hojas. Finalmente, en un tercer ensayo (Ensayo 3), se evaluó la evolución en el tiempo de la acción de un aceite de soja y un aceite mineral, pulverizándose plantines con dichos aceites y extrayendo las hojas de los plantines

(para el armado del ensayo) a las 2 h, 24 h y 1 semana post-aplicación; los plantines se mantuvieron en un invernáculo de vidrio.

En todos los ensayos las hojas tratadas se cortaron en discos de 5,5 cm de diámetro, que se colocaron con su cara adaxial en contacto con agar al 2%, en la base de placas de Petri del mismo diámetro (Figura 1). En la tapa de cada placa se colocó un disco de papel de filtro cubriendo la totalidad del área. Se liberaron 6 adultos de *D. citri* por placa, los que se recolectaron en un pequeño tubo de vidrio que se enfrió por 3 min en freezer a -4 °C inmediatamente antes de la liberación. Las placas se mantuvieron con su base colocada hacia arriba por 24 h a 24 °C y un fotoperíodo de 16:8 (L:O). A las 24 h se revelaron los papeles de filtro por inmersión en una solución de ninhidrina (Sigma-Aldrich) al 1% (m/v en acetona), observando las gotas de mielecilla como manchas púrpura. Se registró el número de gotas y en número de adultos vivos por palca, a las 24 h.

Para cada ensayo cada placa conformó una repetición y se realizaron 10 repeticiones divididas en 3 fechas (cada fecha se consideró como un bloque). El número de gotas por adulto vivo se analizó mediante un modelo lineal generalizado (GLM) y las medias se separaron por un test de Fisher, $p < 0.05$. Se utilizó el software estadístico Infostat, interfase con R (Di Rienzo et al., 2011) .

Cuadro 3. Tratamientos en ensayos de actividad anti-alimentaria.

Tratamiento	%*	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Abamectina	0.05	✓		
Spirotetramat	0.075	✓		
Neem 10000	0.5	✓		
Neem 300	0.25		✓	
SW	0.02		✓	
AS Prodinoleo	1		✓	✓
AM Argenfrut	1		✓	✓
testigo (agua)	...	✓	✓	✓

* Refiere a mL de producto/100 mL de agua.

2.4.3. Evaluación de actividad repelente

Se realizó la evaluación de capacidad repelente de adultos de *D. citri* de los 2 aceites de referencia al 1%, en invernadero. Se estudió la actividad en el tiempo, con sucesivas liberaciones, esto permitió conocer el potencial de estos productos y la duración de la actividad en condiciones semi-controladas.

Se repitió la metodología descrita en 2.4.1.1. Se utilizaron plantines de naranjo dulce (*Citrus sinensis*) de 6 meses de edad (2 plantas por maceta). Dentro de cada jaula se colocaron 2 macetas, una tratada y otra sin tratar como testigo (Figura 1). Cada jaula correspondió a 1 tratamiento. Se realizaron 3 liberaciones, de 30 adultos de *D. citri* cada vez, a las 0 h, 48 h y 1 semana post-aplicación (liberación 1, 2 y 3 respectivamente), retirando cada vez los adultos de la liberación previa. El número de adultos posados sobre cada planta se registró luego de 24 h de cada liberación. Se realizaron 6 repeticiones para cada tratamiento, divididas en 2 fechas (3 repeticiones por fecha).

Para ambos tratamientos el total de adultos en la planta tratada y en el control para cada liberación se compararon mediante tests de Chi cuadrado (χ^2), $p < 0.05$.

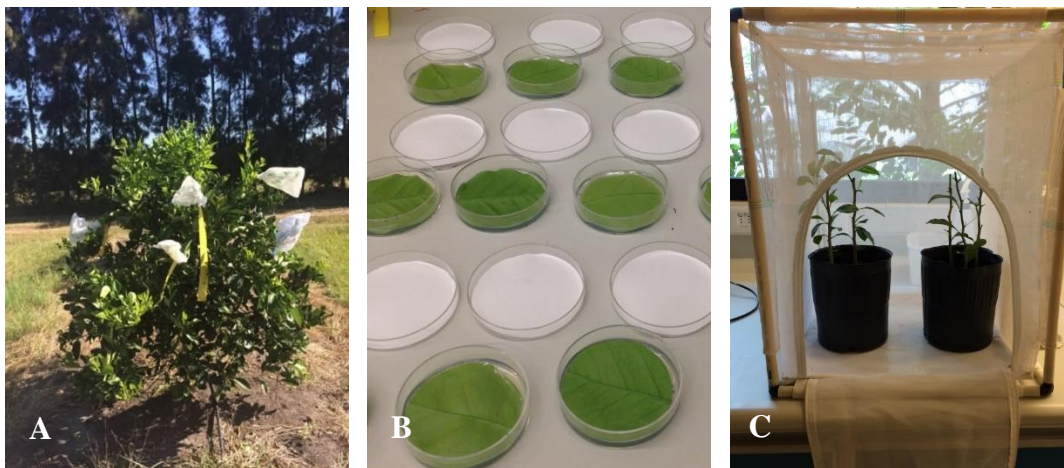


Figura 1. A; Ensayos de campo. B; Placas de evaluación de actividad anti-alimentaria. C; Ensayo repelencia.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Evaluación de actividad insecticida

El estudio de la actividad insecticida en condiciones semi-controladas de invernadero mostró que el aceite de soja Prodinoleo y el aceite mineral Argenfrut presentaron un control de ninfas superior al 90% a los 3 días post-aplicación (Figura 2 A). La abamectina no se diferenció significativamente de los mismos ($p < 0.05$).

De los productos evaluados en ensayo de campo 1 el aceite de soja Prodinoleo y la abamectina se destacaron con un control superior al 80%. El spirotetramat, el aceite mineral y Neem 300 no se diferenciaron significativamente de los mismos (Figura 2 B). En el ensayo de campo 2 los aceites de soja Prodinoleo y mineral Argenfrut fueron nuevamente incluidos. Los resultados no evidencian diferencias significativas de los resultados con el 1° ensayo ($p < 0.05$). Considerando las 4 fechas de evaluación este aceite mineral presentó un control de $73 \pm 17\%$ y el aceite de soja $76 \pm 13\%$ (los resultados se reportan como promedio \pm desviación estándar a menos que se especifique lo contrario). Todos los tratamientos presentaron diferencias significativas con el testigo (Figura 2 C). Los resultados mostraron que los aceites de soja Stoller y Prodinoleo al 1% y los aceites minerales Pioner y Argenfrut al 1% presentaron mayor actividad. A su vez, para el aceite mineral Argenfrut se probó la disminución de un 50% en la dosis y la aplicación conjunta de este último con el coadyuvante Silwet al 0,02%. Este aceite mineral al 1% presentó una mortalidad de ninfas de $66 \pm 39\%$ y una reducción no significativa de la misma al $48 \pm 31\%$ cuando aplicado al 0,5%. La aplicación de aceite al 0.5% junto al Silwet al 0.02% mostró un aumento de la mortalidad a $80 \pm 34\%$, con una tendencia a superar el control del aceite mineral al 1% sin coadyuvante.

En cuanto a los demás tratamientos, tanto en el experimento en invernadero como a campo se observó un mayor efecto insecticida de Neem 300 sobre Neem 10000 (Figura 2 A y B).

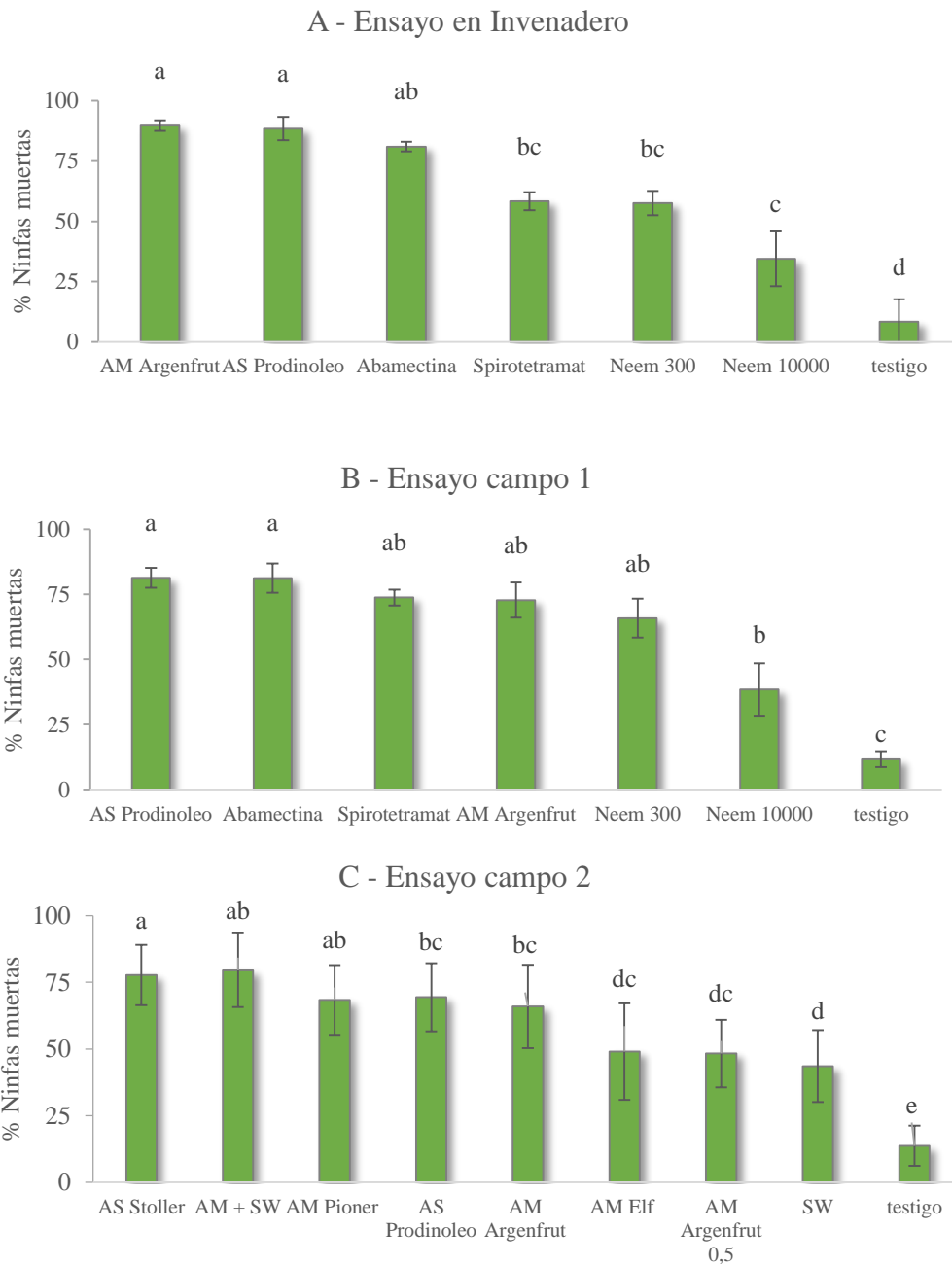


Figura 2. Evaluación de actividad insecticida de ninfas. Las barras representan el promedio del porcentaje de ninfas muertas (del 3° al 5° estadio). A; En invernadero, a los 3 días post-aplicación. B y C; A campo, a los 4 días post-aplicación (B, ensayo 1; C ensayo 2). Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (GLMMIX, Tukey Kramer $p < 0.05$). AS y AM refiere a aceite de soja y aceite mineral. SW refiere a Silwet. Las barras de error representan el error estándar.

2.5.2 Evaluación de actividad anti-alimentaria

La actividad anti-alimentaria en adultos de *D. citri* mostró que todos los productos evaluados redujeron significativamente la alimentación de adultos *D. citri* a las 24 h post-aplicación (Figura 3 A).

Los resultados del ensayo del efecto en el tiempo de aplicación en la actividad anti-alimentaria de aceites mostraron que, en condiciones controladas, ambos productos generan deterrencia en la alimentación a insectos que se enfrentan a la planta recién pulverizada (Figura 3 B). Sin embargo, en insectos que llegan a la planta a las 24 h de la aplicación, solamente el aceite mineral mantiene el efecto, mientras que a la semana de la aplicación ninguno de los productos mostró diferencias significativas frente al control, indicando que no existiría residuo suficiente para disminuir la alimentación de adultos de *D. citri*.

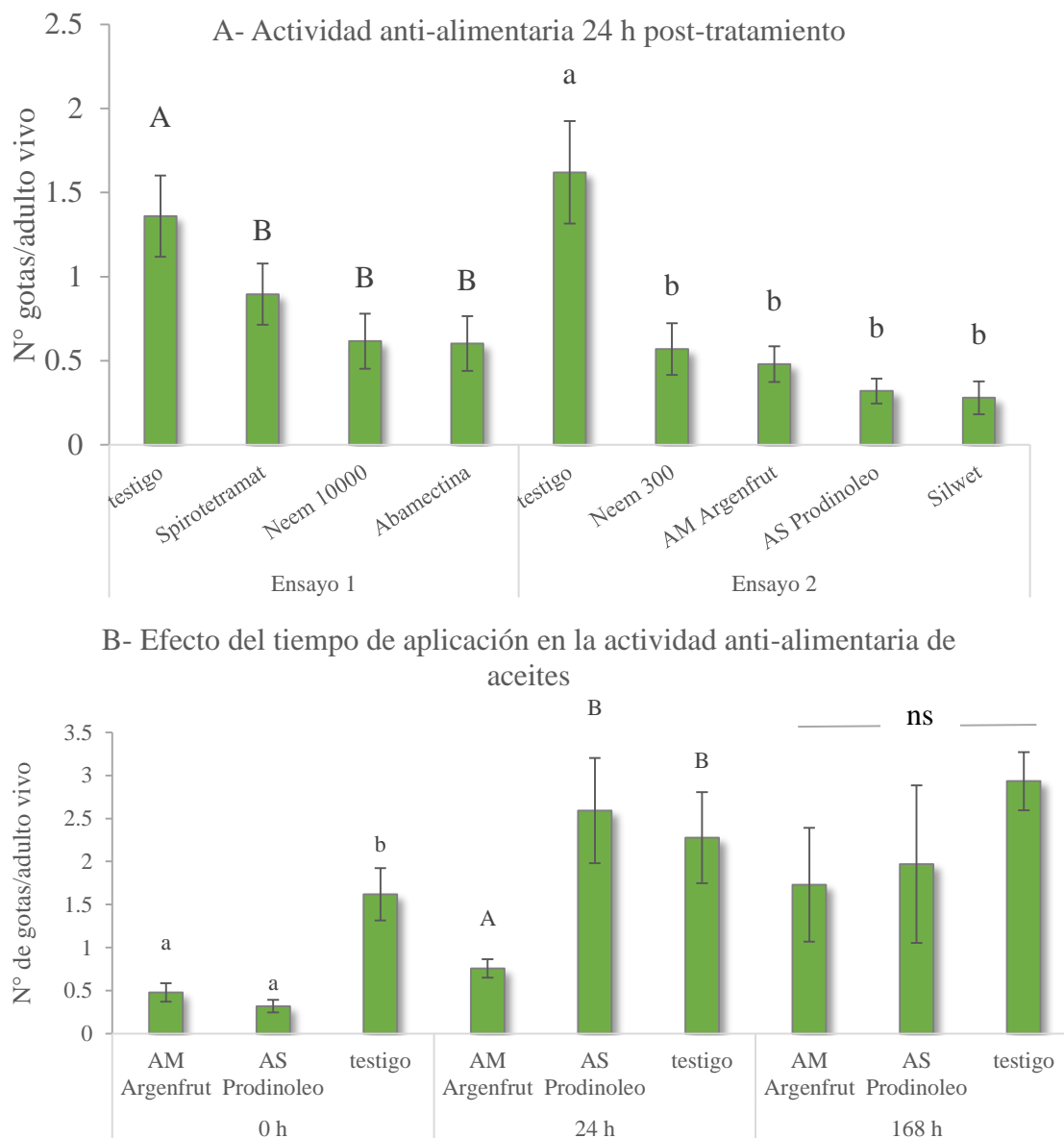


Figura 3. Evaluaciones de actividad anti-alimentaria. Las barras representan el promedio del número de gotas por adulto vivo, a las 24 h de colocados los insectos. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (GLM, Fisher $p < 0.05$). A. Actividad anti-alimentaria a las 24 h post-aplicación. B. Efecto del tiempo de aplicación en la actividad anti-alimentaria de aceites. Las barras de error representan el error estándar.

2.5.3 Evaluación de actividad repelente

Los resultados en invernadero de la duración del efecto repelente de los aceites mostraron que a las 24 h de la 1° y 2° liberación (0 y 48 h post-aplicación) los insectos prefirieron significativamente la planta control a la planta tratada, para ambos aceites ($p < 0.05$) (Figura 4). En la 3° liberación, realizada a 1 semana de la aplicación se observó que el aceite mineral Argenfrut mantendría el efecto, mientras que en el aceite de soja Prodinoleo los insectos se distribuyen equitativamente ($p < 0.05$).

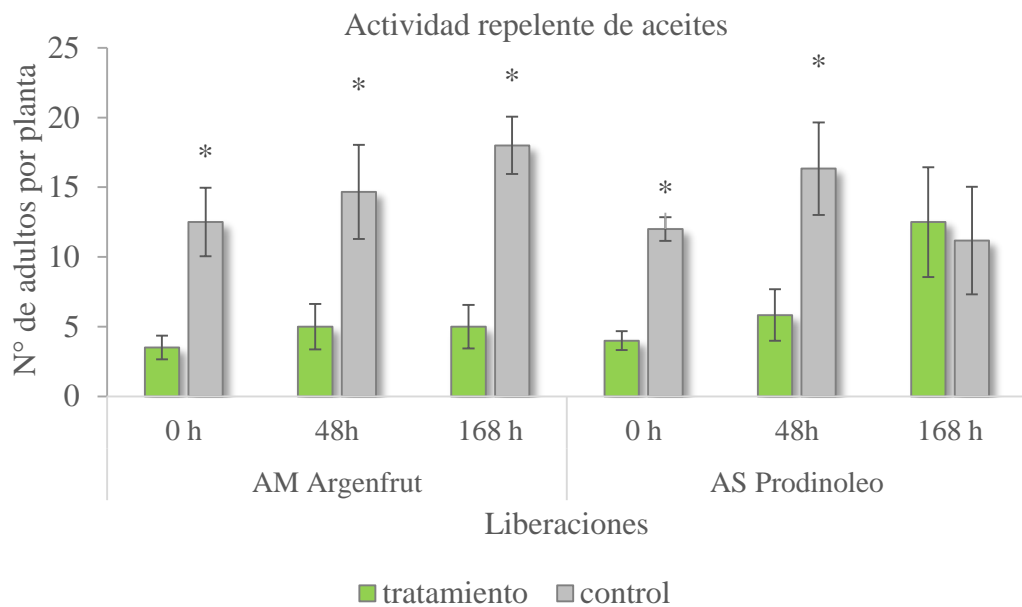


Figura 4. Actividad repelente de aceites. Las barras representan el número de adultos de *D. citri* en la planta con tratamiento y planta control. Se muestran los resultados a las 24 h de liberados los insectos (liberaciones 1, 2 y 3 a 0, 48 h y 1 semana post-tratamiento respectivamente). * indican diferencias significativas entre control y tratamiento (χ^2 , $p < 0.05$). Las barras de error representan el error estándar.

2.6 DISCUSIÓN

Los resultados de actividad insecticida posicionan al aceite de soja, el aceite mineral y la abamectina como altamente eficientes a corto plazo (Figura 1). Estos productos actúan con relativa rapidez debido a sus modos de acción; la acción pesticida de los aceites es mayoritariamente física, por bloqueo de los espiráculos y por lo tanto sofocación (Davidson, 1991); la abamectina es un disruptor de los receptores del ácido gamma-amino butírico y ácido glutámico en el sistema nervioso central y muscular produciendo parálisis (Strong y Brown, 1987). En el caso de spirotetramat, el cual es trasladado sistémicamente dentro de la planta tanto por el xilema como por el floema, y su mecanismo de acción es la inhibición de la biosíntesis de lípidos (Nauen et al., 2008), es necesario que transcurra determinado tiempo para su correcta distribución dentro de la planta y acción sobre el insecto, por lo que la evaluación al 3° y 4° día post-aplicación subvaloró la efectividad de este producto. Si bien los resultados a campo para este producto mostraron una mortalidad de ninfas del 74% al 4° día post aplicación (Figura 2), se han reportado mortalidades de ninfas superiores al 90% a los 13 días post aplicación. A su vez spirotetramat tiene reportado un importante poder residual, proveyendo un control a más largo plazo que los productos que actúan por contacto (Bell et al., 2008). Los derivados de neem mostraron diferentes resultados (Figura 2), siendo el producto con menor concentración de azadirachtina (Neem 300, Cuadro 1) el que mostró mayor mortandad de ninfas. Este mayor poder insecticida podría estar asociado a su mayor concentración de aceite de neem (Cuadro 1), estos resultados sugieren que el poder insecticida estaría dado por la acción física del aceite sobre las ninfas, en mayor medida que por la toxicidad de la azadirachtina.

Los resultados de aplicación conjunta de Silwet y aceite mineral sobre mortalidad de ninfas son consistentes con los reportados por Cocco y Hoy (2008). La adición de este surfactante a la mezcla agua-aceite permite generar una emulsión con tamaño de gota más fina, permitiendo una cobertura más uniforme de la superficie del insecto y aumentando la penetración del producto en los espiráculos (mortalidad por asfixia), mejorando así la eficiencia de la aplicación (Cocco y Hoy, 2008; Davidson, 1991). La aplicación de aceite mineral a la mitad de dosis podría resultar una opción

útil para reducir costos, manteniendo la eficiencia siempre que se aplique junto con Silwet. La utilización de aceites en el manejo de *D. citri* ha sido reportada como eficiente (teniendo en cuenta costos ecológicos) frente a la utilización de insecticidas de amplio espectro (Tansey et al., 2015). Es relevante enfatizar que estos productos se han probado como eficientes controladores de ninfas de *D. citri*, mucho menos móviles que los adultos y por lo tanto más susceptibles a productos que actúan por contacto (Cocco y Hoy, 2008; Nauen et al., 2008; Srinivasan et al., 2008; Weathersbee y McKenzie, 2005), por lo que el momento de aplicación será crítico y deberá basarse en la presencia de brotación joven (donde las mismas se desarrollan) y en el monitoreo de poblaciones de la plaga.

Complementariamente todos los productos evaluados mostraron efecto anti-alimentario y los aceites Argenfrut y Prodinoleo efecto repelente en adultos de *D. citri*, siendo posible el control mediante distintas modalidades de ninfas y adultos de la plaga. La deterrencia en la alimentación es de gran relevancia para este insecto vector, dado que la transmisión de la enfermedad está directamente relacionada con su alimentación. Mientras el producto esté presente en la planta, o incluso concentraciones menores en el correr del tiempo de degradación del mismo, la inducción de la deterrencia en la alimentación puede interferir con la adquisición eficiente y/o transmisión del patógeno del HLB. A su vez esta actividad podría llevar a la reducción del *fitness* afectando negativamente el crecimiento, reproducción y supervivencia del insecto, que podría eventualmente influenciar la dinámica de poblaciones en el tiempo (Boina et al., 2009). La repelencia de aceites minerales ha sido reportada por otros autores, así como también, más específicamente, repelencia de oviposición (Ouyan et al., 2013). Los resultados aquí reportados corroboran que los insectos prefieren no posarse sobre la planta tratada, repelencia que se observa hasta una semana post-aplicación, en las condiciones semi-controladas de este estudio. A su vez, los resultados sugieren que los aceites vegetales también presentan actividad, aunque por menor tiempo, ya que pasada una semana post-aplicación la repelencia ya no se observa. Si bien la repelencia de oviposición no fue evaluada de forma directa en este ensayo, consecuente a la ausencia de los adultos en la planta es de esperar que mientras los productos estén presentes en la planta, la oviposición sea menor. Un

aspecto a tener en cuenta es que en la segunda y tercera liberación los insectos nuevos que se liberan se enfrentan a plantas que han sufrido herbivoría por *D. citri*, y por lo tanto pueden haber generado defensas inducidas (Vivanco et al., 2005). Si bien este hecho puede tener consecuencias sobre la preferencia del insecto, las condiciones del ensayo reflejan las condiciones naturales que se darían a campo.

En el contexto de manejo integrado de plagas es necesario que los productos a utilizar sean inocuos para los organismos benéficos para ser compatibles con el control biológico (Brück et al., 2009); por lo que la selectividad frente artrópodos benéficos es un requerimiento fundamental. La selección de productos presentada en este trabajo cumple en gran medida con este requisito. Los aceites matan a los insectos, ácaros y huevos por contacto; el individuo muere solo si está presente en el momento de la aplicación, los residuos usualmente no afectan directamente la mortalidad. Por su corta residualidad, los aceites no afectan severamente a los artrópodos benéficos que generalmente son más móviles que los insectos fitófagos y pueden evadir con más facilidad la aplicación (Davidson, 1991). Los aceites minerales, el Silwet y su aplicación conjunta, no son tóxicos, ni de forma aguda ni residual, para *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae), el principal parasitoide de *D. citri*. Por tanto estos productos por separado y en conjunto se posicionan como compatibles con el control biológico (Cocco y Hoy, 2008; Davidson, 1991). El spirotetramat puede considerarse seguro para la mayoría de los artrópodos benéficos en base a numerosos ensayos de campo y semi-campo, donde no se observaron efectos adversos a largo plazo (Brück et al., 2009). La azadirachtina se ha reportado como selectiva a insectos fitófagos con mínimo efecto sobre insectos benéficos (Weathersbee y McKenzie, 2005). El efecto de la abamectina sobre insectos benéficos es discutido; se ha citado que la misma resulta menos tóxica para ácaros predadores que para sus presas (Zhang y Sanderson, 1990), pero al ser un insecticida neurotóxico la selectividad es limitada.

Los productos testados en este trabajo, además de ser eficientes frente a *D. citri*, son ampliamente utilizados para el control de numerosas plagas citrícolas. Los aceites son controladores del minador de la hoja, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae), cochinillas en general, áfidos, moscas blancas, entre otros (Davidson, 1991). La abamectina es un insecticida y acaricida de amplio espectro (Strong y

Brown, 1987), y es utilizada para el control del minador de la hoja, que al igual que *D. citri*, ovipone en brotes tiernos, compartiendo el nicho ecológico (Rae et al., 1997). La actividad insecticida de la azadiractina ha sido demostrada para numerosas especies de insectos plaga, produciendo disrupción de la alimentación, reproducción y/o desarrollo (Weathersbee y McKenzie, 2005). En Uruguay está registrado también para el control de mosca de la fruta (MGAP-DGSA, 2016). Spirotetramat está recomendado en cítricos para el control insectos picosuctores en general (Bell et al., 2008).

Como se ha mencionado el objetivo de los programas de manejo de *D. citri* debe ser reducir las poblaciones del psílido en las quintas comerciales, disminuyendo el número de aplicaciones de pesticidas para bajar el impacto negativo sobre los enemigos naturales y los costos (Rogers et al., 2009). La selección del producto y el momento de aplicación serán críticos y deberán basarse en el monitoreo de poblaciones tanto de *D. citri* como de otras plagas que puedan ser controladas en simultáneo. La sincronización de aplicaciones para controlar distintas especies y reducir así el número de intervenciones es una estrategia relevante en el contexto de manejo integrado. A su vez el hecho de que los productos seleccionados no presenten un 100% de mortalidad hace posible que sean compatibles con el control biológico, que se actuará sobre la población remanente; y que esta estrategia es viable de ser implementada en las condiciones del Uruguay, en ausencia de HLB.

El HLB ha sido devastador para la industria citrícola a nivel mundial, con la destrucción de aproximadamente 100 millones de árboles de cítricos en 40 países, poniendo bajo amenaza la sostenibilidad de la industria citrícola (Boina y Bloomquist, 2015). En este contexto Uruguay se encuentra hasta el momento en una situación excepcional, que debe ser tomada como una oportunidad para desarrollar y poner en práctica rápidamente estrategias de control de las poblaciones de este insecto, en el marco de una citricultura sostenible, respetuosa con los enemigos naturales y medio ambiente. Así, el tipo de productos evaluados en este trabajo, para mantener un control químico compatible con un manejo integrado de plagas resulta fundamental.

2.7 CONCLUSIONES

Los resultados de los experimentos en condiciones semi-controladas y campo demuestran consistentemente que los aceites minerales y vegetales, productos de bajo impacto para insectos benéficos, con baja residualidad, sin riesgo de generación de resistencia y que no dejan residuos en fruta, resultan una herramienta interesante para un manejo integrado de *D. citri*, atacando, mediante diferentes modalidades, tanto adultos como estadios inmaduros de la plaga. La abamectina, el spirotetramat y los aceites de neem resultan alternativas aplicables para la rotación de productos.

2.8 BIBLIOGRAFÍA

- Asplanato G, Pazos J, Buenahora J, Amuedo S, Rubio L, y Franco J. 2011. El psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae): Primeros estudios bioecológicos en Uruguay. Serie FPTA N° 28. Montevideo: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). 48p.
- Bell J, Krueger S, y Steffens R. 2008. Development of Movento™ for sucking pest control on annual and perennial crops in the United States. Bayer CropScience Journal, 61. Monheim am Rhein: Bayer CropScience AG. 315-328.
- Boina DR, y Bloomquist JR. 2015. Chemical control of the Asian citrus psyllid and of huanglongbing disease in citrus. Pest Management Science, 71: 808-823.
- Boina DR, Rogers ME, Wang N, y Stelinski LL. 2010. Effect of pyriproxyfen, a juvenile hormone mimic, on egg hatch, nymph development, adult emergence and reproduction of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. Pest Management Science, 66: 349-357.
- Boina DR, Onagbola EO, Salyani M, y Stelinski LL. 2009. Antifeedant and sublethal effects of imidacloprid on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. Pest Management Science, 65: 870-877.
- Bové JM. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Journal of Plant Pathology, 88: 7-37.
- Brück E, Elbert A, Fischer R, Krueger S, Kühnhold J, Klueken AM, Nauen R, Niebes J, Reckmann U, Schnorbach H, Steffens R, y Waetermeulen X. 2009. Movento, an innovative ambimobile insecticide for sucking insect pest control in

- agriculture: Biological profile and field performance. *Crop Protection*, 28 838-844.
- Cocco A, y Hoy M. 2008. Toxicity of organosilicone adjuvants and selected pesticidicidas to the Asian citrus psyllid (Hemiptera:Psyllidae) and its parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). *Florida Entomologist*, 91: 610-620.
- Davidson NA. 1991. Managing Insects and Mites with Spray Oils. IPM Education and Publications, Statewide Integrated Pest Management, Publication 3347. Oakland, California: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. 44p.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, y Robledo CW. 2011. InfoStat. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar/>.
- Grafton-Cardwell EE, Stelinski LL, y Stansly PA. 2013. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. *Annual Review of Entomology*, 58: 413-432.
- Lizondo M, Martínez D, Pérez D, Augier L, y Gastaminza G. 2014. Eficacia de Harrier en el control de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) en cítricos del noroeste argentino. En: IV Simposio Nacional y I Congreso Latinoamericano de Citricultura (2014, Salto, Uruguay).
- Mann RS, Tiwari S, Smoot JM, Rouseff RL, y Stelinski LL. 2012. Repellency and toxicity of plant-based essential oils and their constituents against *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Applied Entomology*, 136: 87-96.
- MGAP-DGSA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Servicios Agrícolas, Uruguay). 2016. Registro de productos fitosanitarios [En línea]. Consultado 7 diciembre 2016. Disponible en: <https://www.mgap.gub.uy/profit/wwproductos.aspx>.
- MGAP-DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, Uruguay). 2016. Anuario Estadístico Agropecuario [En línea]. Consultado 16 mayo 2017. Disponible en:

<http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016>.

- Nauen R, Reckmann U, Thomzik J, y Thielert W. 2008. Biological profile of spirotetramat (Movento) - a new two-way systemic (ambimobile) insecticide against sucking pest species. Bayer CropScience Journal, 61. Monheim am Rhein: Bayer CropScience AG. 403-436.
- Ouyan G, Fang X, Lu H, Zhou X, Meng X, Yu S, Guo M, y Xia Y. 2013. Repellency of five mineral oils against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). Florida Entomologist, 96: 974-982.
- Rae DJ, Liang WG, Watson DM, Beattie GAC, y Huang MD. 1997. Evaluation of petroleum spray oils for control of the Asian citrus psylla, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae), in China International Journal of Pest Management, 43: 71-75.
- Rogers ME, Stansly PA, Stelinski LL, y Burrow JD. 2014. Quick reference guide to citrus insecticides and miticides (ENY-854). Gainesville: University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences. Disponible en: <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN80700.pdf>.
- Rogers ME, Stansly PA, y Stelinski LL. 2009. 2009 Florida citrus pest management guide: Asian citrus psyllid and citrus leafminer (ENY-734). Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences. Disponible en: <http://www.crec.ifas.ufl.edu/extension/greening/PDF/Huanglongbing-CitrusGreening.pdf>.
- Sandoval-Rincón JA, Curti-Díaz SA, Díaz-Zorrilla U, Medina-Urrutia VM, y Robles-González MM. 2010. Alternativas para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos (*Diaphorina citri* Kuwayama). En: VI Simposio Internacional Citrícola (6°, 2010, Tecomán, Colima). 154-173.
- Srinivasan R, Hoy MA, Singh R, y Rogers ME. 2008. Laboratory and field evaluations of Silwet L-77 and kinetic alone and in combination with imidacloprid and abamectin for the management of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). Florida Entomologist, 91: 87-100.

- Strong L, y Brown TA. 1987. Avermectins in insect control and biology: a review. *Bulletin of Entomological Research*, 77: 357-389.
- Tansey JA, Jones MM, Vanaclocha P, Robertson J, y Stansly PA. 2015. Costs and benefits of frequent low-volume applications of horticultural mineral oil for management of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Crop Protection*, 76: 59-67.
- Vivanco JM, Cosio E, Loyola-Vargas VM, y Flores HE. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y ciencia*, 341. Barcelona: Prensa Científica, S.A. 68-75.
- Weathersbee AA, y McKenzie CL. 2005. Effect of a neem biopesticide on repellency, mortality, oviposition, and development of *Diaphorina citri* (Homoptera : Psyllidae). *Florida Entomologist*, 88: 401-407.
- Yamamoto PT, Felipe MR, Sanches AL, Coelho JHC, Garbim LF, y Ximenes NL. 2009. Eficácia de Inseticidas para o Manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em Citros. *BioAssay*, 4: 1-9.
- Zhang Z, y Sanderson JP. 1990. Relative toxicity of abamectin to the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) and twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 83: 1783-1790.

3. DESARROLLO DE POTENCIALES ATRAYENTES DE ADULTOS **DE *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: LIVIIDAE)¹**

3.1 RESUMEN

El psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), es actualmente la plaga más importante de los cítricos en el mundo, debido a su rol como vector de ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp., agente causal del letal huanglongbing (HLB), que no tiene cura. El control de *D. citri* es un componente clave del manejo del HLB. Se ha demostrado que estímulos emitidos por los brotes tiernos juegan un rol importante en la detección y localización de hospederos de *D. citri* y que ésta utiliza muchas modalidades sensoriales al seleccionarlo, incluyendo visión, gusto, vibraciones y olfato. La identificación de potenciales atrayentes puede ser útil en el manejo del comportamiento y control de *D. citri*, aumentando por ejemplo la atracción de trampas amarillas para el monitoreo de adultos. El objetivo de este estudio fue contribuir al conocimiento de compuestos orgánicos volátiles emitidos por cítricos, que pudiesen estar relacionados a la preferencia por el hospedero a modo de ser utilizados en el desarrollo a partir de los mismos de potenciales atrayentes. Se realizaron colectas de volátiles de 6 especies cítricas sobre las que se han reportado datos de preferencia de *D. citri* (*Citrus medica*, *Citrus limón*, *Citrus limonia*, *Citrus jambhiri*, *Citrus sinensis*, *Citrus paradisi*), en cámaras de aireación y los mismos se analizaron por GC-MS. Se observó que los perfiles de las especies preferidas fueron similares. A partir del perfil de pomelo (hospedero óptimo), se preparó una mezcla sintética que fue testada junto con sus compuestos mayoritarios (limoneno y metil antranilato de metilo). Se utilizaron distintas concentraciones junto con trampas amarillas en ensayos 2-choice en jaulas. Se observó que tanto la mezcla pomelo diluida como limoneno aumentaron las capturas de adultos de las trampas tratadas.

Palabras clave: Psílido asiático de los cítricos, volátiles, atrayentes.

¹ Este artículo fue escrito de acuerdo a las normas para autores de Agrocencia Uruguay.

DEVELOPMENT OF POTENTIAL ATTRACTANTS FOR *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: LIVIIDAE) ADULTS

3.2 SUMMARY

The asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), is currently the most important citrus pest worldwide, mainly because of its role as vector of ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp., causal agent of lethal huanglongbing (HLB), which does not have a cure. *D. citri* populations control is a key component of HLB management. It has been demonstrated that stimuli emitted by young flush have an important role in detection and location of *D. citri* hosts, and that *D. citri* integrates different stimuli to select it, including vision, olfaction, vibrations and taste. Identifying potential attractants could be useful for behavior management and control of this insect, enhancing for instance yellow sticky traps’ catches for monitoring adults. The objective of this study was to contribute to the knowledge of the volatile compounds emitted by different species that might be related to the host preference of *D. citri*, to be used in the development from them of potential attractants. Volatile collections of 6 citrus species, which preference information is available, (*Citrus medica*, *Citrus limón*, *Citrus limonia*, *Citrus jambhiri*, *Citrus sinensis*, *Citrus paradisi*), were performed in aeration chambers and analyzed by GC-MS. Results showed that volatile profiles of preferred species were similar. Based on pomelo profile (optimum host), a synthetic blend was prepared which was tested together with its main compounds (limonene and methyl N-methylantranilate). Different concentrations were used together with yellow sticky traps against *D. citri* adults in two-choice cage tests. It was observed that as the diluted pomelo blend as limonene enhanced the yellow sticky traps adult catches.

Keywords: Asian citrus psyllid, volatiles, attractants.

3.3 INTRODUCCIÓN

El psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), es actualmente la plaga más importante de los cítricos en el mundo, debido principalmente a su rol como vector de ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp., el complejo de bacterias asociadas al floema que causan el huanglongbing (HLB) en los cítricos; enfermedad altamente destructiva, que hasta el momento no tiene cura. En el mundo el control de las poblaciones de *D. citri*, para reducir la dispersión de la enfermedad, es uno de los tres componentes claves del manejo del HLB, junto con la utilización de material vegetal de vivero libre del patógeno y la eliminación de árboles infectados (fuente de inóculo). Los programas de manejo en América se han centrado en el control del vector. dada la dificultad de la detección temprana de la enfermedad y la rápida dispersión del HLB (Grafton-Cardwell et al., 2013).

En los psílicos el comportamiento de selección de hospederos es complejo y conlleva distintas modalidades sensoriales y estados fisiológicos (Patt y Setañou, 2010). Muchos estudios han demostrado que los estímulos emitidos (aroma, color, textura, etc.) por los brotes tiernos juegan un rol muy importante en la detección, localización y evaluación de potenciales hospederos de *D. citri* (Martini et al., 2014; Patt et al., 2011; Patt y Setañou, 2010; Stockton et al., 2016; Wenninger et al., 2009). Actualmente se sabe que *D. citri* utiliza muchas modalidades sensoriales para seleccionar el hospedero, incluyendo visión, gusto, audición y olfacción (Stockton et al., 2016). El rol de las claves olfativas para orientar adultos de *D. citri* ha sido ampliamente probado y reportado (Mann et al., 2011; Patt y Setañou, 2010; Setañou et al., 2012; Wenninger et al., 2009). Mientras que el aroma por sí solo no funcionaría como una clave de orientación, mejoraría la respuesta a las claves visuales. La respuesta de *D. citri* a los aromas emitidos por los brotes tiernos dependería de su composición de volátiles, proporciones y concentración (Patt y Setañou, 2010).

Se ha reportado una amplia gama de hospederos de *D. citri* dentro de la familia de las rutáceas, en las que la oviposición y el desarrollo ninfal está principalmente afectado por la producción de brotes (Halbert y Manjunath, 2004). A su vez se ha observado comportamiento diferencial en la biología del insecto frente a diferentes

genotipos de la familia de las Rutáceas influyendo sobre la postura de huevos, emergencia de adultos o el ciclo de vida; que podría estar explicado por una combinación de factores tales como diferencias en la fenología del hospedero, microclima de las canopias, entre otros (Alves et al., 2014; Chan Teck et al., 2011).

Estudios locales de preferencia de oviposición han demostrado que el naranjo dulce (*Citrus sinensis*) y el pomelo Duncan (*Citrus paradisi*) son hospederos preferidos por *D. citri* y que el cidro (*Citrus medica*), resultó en todos los casos el menos preferido (Buenahora et al., 2015; Pereira das Neves et al., 2015a; Pereira das Neves et al., 2015b). El naranjo dulce y el pomelo Duncan han sido reportados también como hospederos destacados para el psílido por otros autores (Alves et al., 2014; Liu y Tsai, 2000; Sétamou et al., 2008).

Las trampas amarillas para monitorear las poblaciones de *D. citri* son utilizadas en huertos comerciales, pero su efectividad es variable y debatida, en particular cuando las poblaciones son bajas (Amuedo, 2010; Godfrey et al., 2013; Miranda et al., 2017). La identificación de potenciales atrayentes de plantas hospederas puede ser útil en el manejo y control de *D. citri*, con el fin de aumentar la atracción de trampas amarillas para el monitoreo de adultos o para el desarrollo de tecnologías “*push and pull*” o “*attract and kill*” (Grafton-Cardwell et al., 2013; Robbins et al., 2012). Estas tecnologías proponen utilizar estímulos repelentes o deterrentes de una plaga en cuestión, para bajar las poblaciones de la misma sobre el cultivo de interés y a su vez utilizar atrayentes, como feromonas, volátiles del hospedero o combinaciones de ellos, en otras áreas como cultivos trampa donde pueden ser controladas con mayor facilidad (Cook et al., 2007). Mundialmente hasta el momento el desarrollo de estas estrategias para controlar a *D. citri* está aún en etapas de investigación (Godfrey et al., 2013).

El objetivo del presente estudio fue contribuir al conocimiento de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por distintas especies de cítricos, que pudiesen estar relacionados a la preferencia por el hospedero, y que pudiesen ser utilizados para el manejo del comportamiento del insecto; y el desarrollo a partir de los mismos de atrayentes para ser utilizados en conjunto con trampas amarillas.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Colecta y análisis de volátiles

Se seleccionaron 6 especies de cítricos: Cidro (*Citrus medica*), Limón ‘Eureka’ (*Citrus limon*), Limón ‘Cravo’ (*Citrus limonia*), Limón rugoso (*Citrus jambhiri*), Naranja dulce (*Citrus sinensis*) y Pomelo Duncan (*Citrus paradisi*).

Para estudiar los volátiles (VOCs) emitidos por cada especie, las plantas se podaron antes del ensayo para estimular la brotación. Las plantas con brotes tiernos se colocaron dentro de cámaras de vidrio/teflón (37.5 cm de alto x 24.0 cm diámetro) y los VOCs emitidos se muestrearon mediante arrastre por un flujo (1.0 L/min) de aire humidificado y filtrado mediante carbón activado (Figura 1). Este flujo se logró mediante una bomba (N 035 AT.18, marca KNF, Alemania) y succión por bombas (Personal Air Sampling Apex, Casella Cel.). Los compuestos se adsorbieron en columnas con 50 mg de HaySep-Q 80/100 mesh (Grace®) como adsorbente. Se realizaron 3 repeticiones (siendo una repetición 1 maceta con 1-3 plantas) por fecha y 1 control sin plantas y se repitió la colecta para cada especie en 2 fechas. Las colectas de volátiles se realizaron durante 72 h. Los volátiles se eluyeron del adsorbente con 1 mL de hexano, concentrados con N₂ a 100 µL y fueron analizados mediante GC-MS. El análisis por GC-MS se realizó utilizando un QP-2010 Shimadzu GC-MS, equipado con una columna apolar (30m × 0.25 mm, 0.25 µm; AT-5 MS, Alltech), y operado con un flujo constante de gas portador de 1 mL/min (He). La temperatura del horno del GC se programó de la siguiente manera: 40 °C (1 min), luego subió a 280 °C a razón de 5 °C/min, y se mantuvo en 280 °C por 1 min. La temperatura del inyector se mantuvo en 250 °C y la temperatura de la interfase de 280 °C. La inyección fue de 1 µL en modo splitless y el espectro de masas se adquirió desde m/z 28 a 350 (70 eV, en modo scan). Para el cálculo de los índices de retención se inyectó a su vez una mezcla de n-alcános (100 ppm cada uno, en hexano) (González et al., 2012). El trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecología Química, de la Facultad de Química, Montevideo, Uruguay.

Los compuestos se identificaron tentativamente mediante comparación de sus de índices de retención y espectros de masas con los reportados por las bases de datos

Adams y NIST-08 (Adams, 2007; NIST Mass Spec Data Center, 2017) . Se analizaron las diferencias en contenido de determinados compuestos entre las diferentes especies por comparación de sus áreas relativas.

Los perfiles se compararon mediante un análisis de compuestos principales (PCA) en base a las áreas relativas de cada compuesto. Se utilizó el software estadístico R (versión 0.99.892 – © 2009-2016 RStudio, Inc.) (RStudioTeam, 2015).

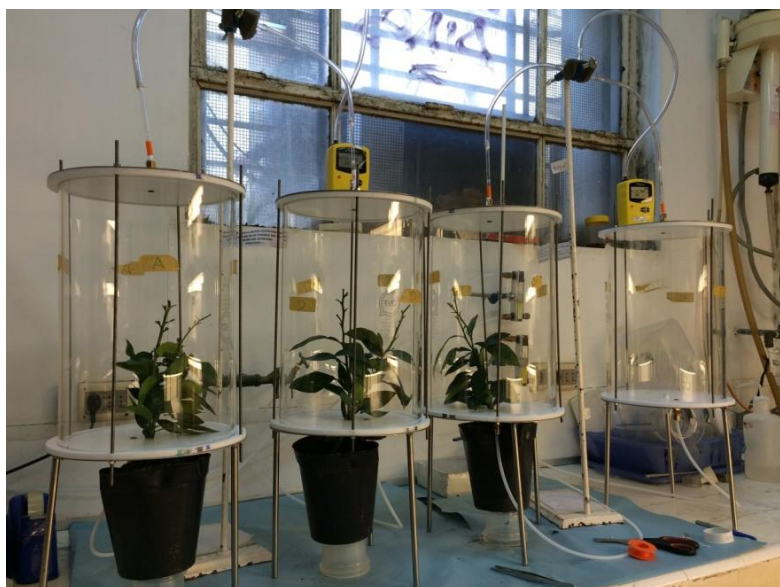


Figura 1. Sistema de colecta de VOCs.

3.4.2. Preparación de atrayentes sintéticos

Se preparó una mezcla sintética imitando los VOCs emitidos por Pomelo Duncan, denominado “Mezcla Pomelo” (MP), uno de los hospederos reportado como preferido (Buenahora et al., 2015; Liu y Tsai, 2000; Pereira das Neves et al., 2015a; Pereira das Neves et al., 2015b). Para ello se tomaron los 5 compuestos que constituían el 95% de la composición (porcentajes relativos), las proporciones de los compuestos en la mezcla se detalla en la Tabla 1. Se evaluó dicha mezcla a dos concentraciones

(Tabla 2). También se probaron por separado en las mismas concentraciones que en la MP, su compuesto mayoritario (Limoneno), que a su vez ha sido reportado como atrayente (Mann et al., 2012b) y el metil antranilato de metilo, que fue uno de los compuestos comunes e importantes en las especies preferidas (ver 2.5.1). Los compuestos utilizados para la preparación de mezcla y estímulos atrayentes fueron obtenidos de Sigma-Aldrich y TCI Chemicals America.

Se evaluó como control positivo la colecta de VOCs de pantines de Valencia (ver 2.4.3), considerándose la colecta representativa de una mezcla de aromas de cítricos a los que *D. citri* se enfrentaría en la naturaleza, en cuanto a composición y concentraciones (se utilizó la colecta tal como fue obtenida de los plantines, sin concentrar). Se resumen los estímulos estudiados en la Tabla 2.

Tabla 1. Composición de la mezcla sintética utilizada como atrayente junto con trampas amarillas.

MP	%
Limoneno	62
Metil antranilato de metilo	19
Beta-Ocimeno	11
Beta-Elemeno	2
Cariofileno	2
Minoritarios	5

Tabla 2. Estímulos evaluados como atrayentes junto con trampas amarillas.

Estímulo	Concentración (µg/µL)
Colecta VOCs Valencias	X
MP	0.1
MP	0.01
Metil antranilato de metilo (MMA)	0.1
Metil antranilato de metilo	Como en MP 0.01
Limoneno	Como en MP 0.01

3.4.3. Evaluación de atrayentes

Los insectos utilizados en los bioensayos fueron obtenidos de colectas de campo semanales y mantenidos en plantines de Mirto (*Murraya paniculata* (L.) Jack.) en cajas de plexiglás, dentro de una sala en condiciones semi-controladas a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $63\pm 2\%$ HR y con un fotoperiodo de 14:10 (L:O), en el Citrus Research and Education Center, University of Florida, Lake Alfred, Florida, EEUU.

Para evaluar las mezclas atrayentes y compuestos por separado se realizó un experimento en invernadero de vidrio (8.0 x 9.60 x 6.30 m aprox.), donde la temperatura y humedad fueron de $35 \pm 6^{\circ}\text{C}$ y $69 \pm 21\%$ durante los experimentos. Se utilizaron jaulas de malla blanca de 90 x 60 x 55 cm (Figura 2A). En paredes opuestas de cada jaula se colocaron enfrentadas 2 trampas amarillas 8x8 cm, una con 100 μL del estímulo a evaluar, en la otra 100 μL de solvente. Los estímulos se colocaron en septos plásticos ([BEEM 1001 Capsules for Embedding, Size 00](#)) (Figura 2B). 40 adultos de *D. citri* fueron liberados en cada jaula y 24 h post-liberación se registró el número de adultos en cada trampa.

Las jaulas se distribuyeron aleatoriamente en el invernadero, con una separación mínima de 2 m entre ellas, y a cada jaula se le adjudicó un tratamiento. El diseño del experimento fue de bloques completamente aleatorizados, cada tratamiento se evaluó una vez en cada fecha, y se repitió el experimento en 10 fechas, conformando 10 repeticiones en total. Los tratamientos fueron re-aleatorizados en cada fecha, para evitar sesgos dados por la ubicación de las jaulas.

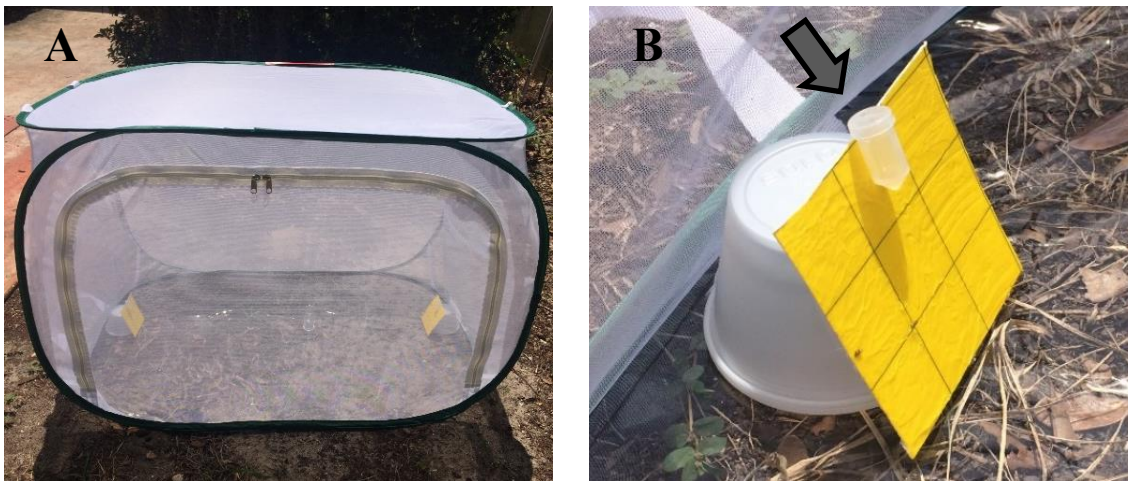


Figura 2. Bioensayo de evaluación de atrayentes. Jaulas (A) y trampas con septos utilizados como estímulos (B).

Para cada tratamiento, el número de psílidos en la trampa control y en el tratamiento se compararon mediante test de Chi-cuadrado, $\alpha = 0.05$. A su vez la proporción de insectos en la trampa tratada respecto al total el en cada tratamiento se analizó con un modelo linear generalizado (GLM) asumiendo distribución binomial. Las medias se separaron mediante un test de Tukey-Kramer, $\alpha = 0.05$. Se utilizó el software estadístico R (versión 0.99.892 – © 2009-2016 RStudio, Inc.) (RStudioTeam, 2015).

Para el control positivo se realizó una colecta de volátiles *in vivo* de plantines enmacetados de Valencia (*Citrus sinensis*), los mismos fueron podados previamente para promover la brotación. Para la colecta se utilizó un sistema similar al utilizado en 2.4.1. El sistema consistió de domos de vidrio de 40 cm de alto y 23 cm de diámetro interno, y plataformas de 2.5 cm de ancho de politetrafluoroetileno en la base. La canopia de cada planta se colocó dentro del sistema a través de un orificio de 1 cm de diámetro en las plataformas (las plataformas se abren de manera que la planta pueda ser introducida sin daños). Los compuestos volátiles emitidos fueron forzados hacia la salida por un flujo de aire limpio 1.0 L/min y un vacío de 0.6 L/min y adsorbidos en 30 mg del adsorbente HayeSepQ (Volatile Assay Systems, Rensselaer, NY, USA). A

las 24 horas los mismos se desorbieron de con 150 μL de CH_2Cl_2 . Los tratamientos evaluados se detallaron en la sección 2.4.2.

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Colecta y análisis de volátiles

Los resultados de las colectas de volátiles *in vivo* de las 6 especies estudiadas mostraron, en conjunto, que más del 90% del perfil estuvo compuesto por monoterpenos hidrocarburos, antranilatos de metilo, monoterpenos oxigenados y sesquiterpenos (Figura 3).



Figura 3. Perfil global de VOCs de especies cítricas estudiadas.

En total se identificaron 60 compuestos y la cantidad total fue diferente para cada especie: 35 en limón ‘Cravo’, 34 en cidro, 28 en naranja dulce, 23 en Limón ‘Eureka’,

12 en limón rugoso y 9 en pomelo Duncan (Figura 4). Todas las especies presentaron gran cantidad de limoneno, siendo este compuesto junto con metil antranilato de metilo y cariofileno, los únicos presentes en las 6 especies estudiadas (Figura 4). En el apéndice 1 se presentan los datos cuantitativos de la composición de los VOCs emitidos por las 6 especies. Los perfiles de las 6 especies presentaron diferencias en la composición y en sus cantidades relativas (Figura 3, Apéndice 1).



Figura 4. Mapa de calor de la composición de VOCs de las 6 especies cítricas estudiadas. La intensidad de gris se relaciona con la cantidad de compuesto en cada especie.

El análisis de componentes principales realizado sobre las áreas relativas de los compuestos para cada especie, explicó el 62.9% de la varianza total (PC1 36% y PC2 26.9%) y agrupó a pomelo Duncan, naranjo dulce y limón rugoso, parcialmente por sus altos contenidos de limoneno y metil antranilato de metilo (Figura 5).

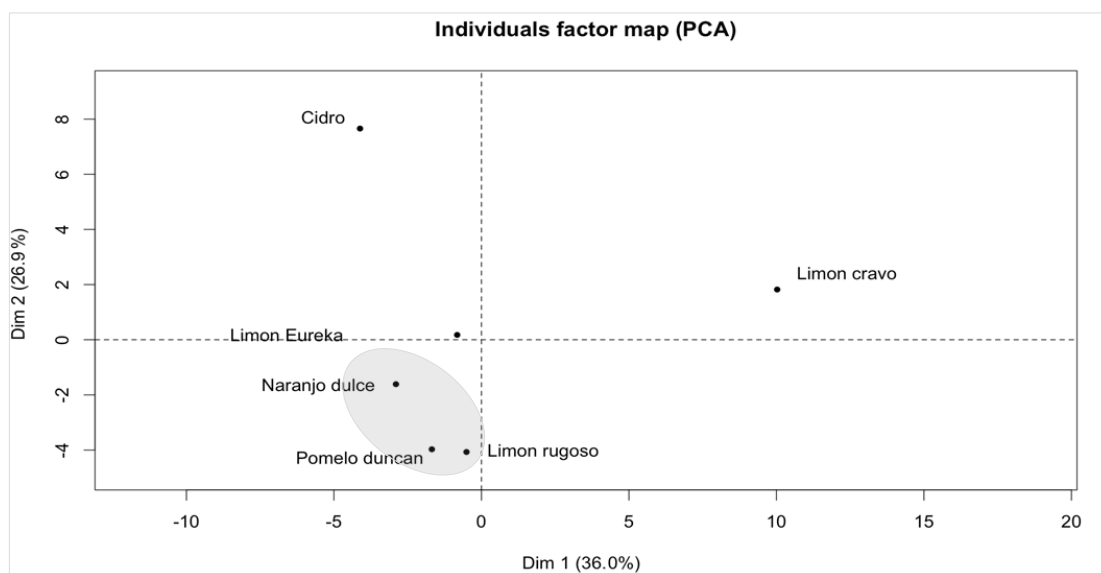


Figura 5. Análisis de componentes principales de las áreas relativas de los compuestos VOCs de las 6 especies cítricas estudiadas.

3.5.2. Evaluación de atrayentes

Los resultados de la evaluación de potenciales atrayentes mostraron un grupo de estímulos que resultó atrayente (MP 1/1000, VOCs Valencias, Limoneno), un grupo que no tuvo efecto (MMA 1/100 y 1/1000) y un estímulo fue repelente (MP 1/100) (Figura 6). Se observó un fuerte efecto concentración en la Mezcla Pomelo que pasó de tener un efecto repelente en una concentración de 1/100 a ser atrayente 10 veces más diluida (Figura 6). El metil antranilato de metilo no mostró un efecto significativo en ninguna de las concentraciones testadas. Finalmente se observó que 3 estímulos

aumentaron significativamente la atracción de las trampas amarillas frente a las trampas sin tratar (Figura 6).

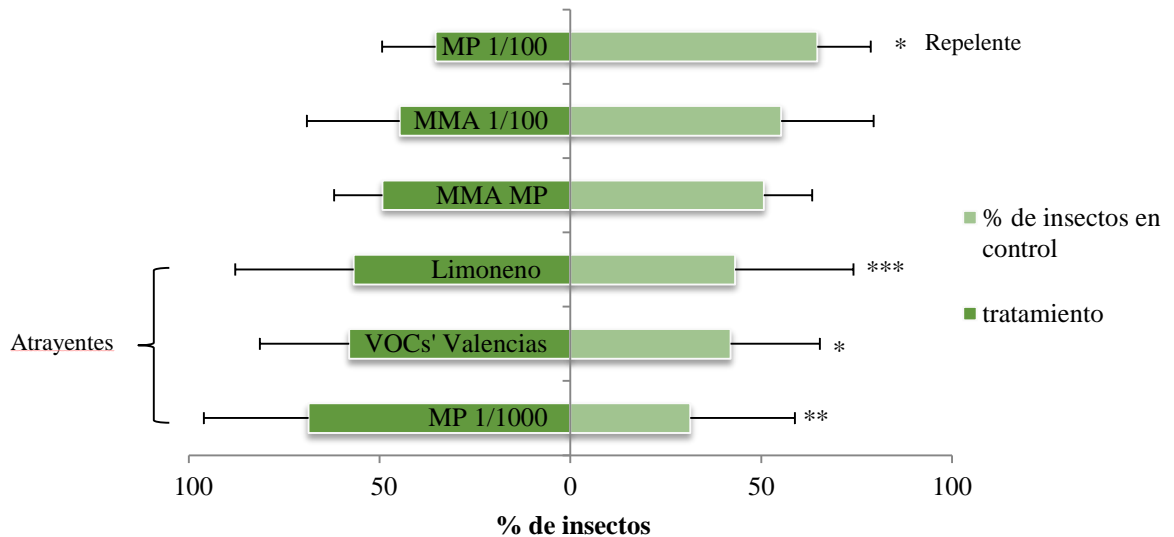


Figura 6. Evaluación de atrayentes. Los resultados se expresan como promedio de adultos capturados en trampas tratadas (χ^2 test, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$). MP = mezcla pomelo, MMA = metil antranilato de metilo, MMA MP = metil antranilato de metilo 19 % 1/1000 –como en mezcla pomelo-, Limoneno = limoneno 62 % 1/1000 -como en mezcla pomelo-. Las barras de error indican la desviación estándar.

No se observaron diferencias significativas entre los estímulos atrayentes, MP 1/1000, su compuesto mayoritario Limoneno y los volátiles naturales (volátiles Valencias); pero sí de éstos con MP 1/100 (Figura 7). Se observó que el comportamiento de estos insectos presenta alta variabilidad (Figura 7). Pese a esto, es interesante el hecho de que los volátiles naturales (colecta Valencias) fue el estímulo que presentó la mayor consistencia, mostrando efecto neutro o de atracción, pero no un efecto invertido como se observó para los demás estímulos.

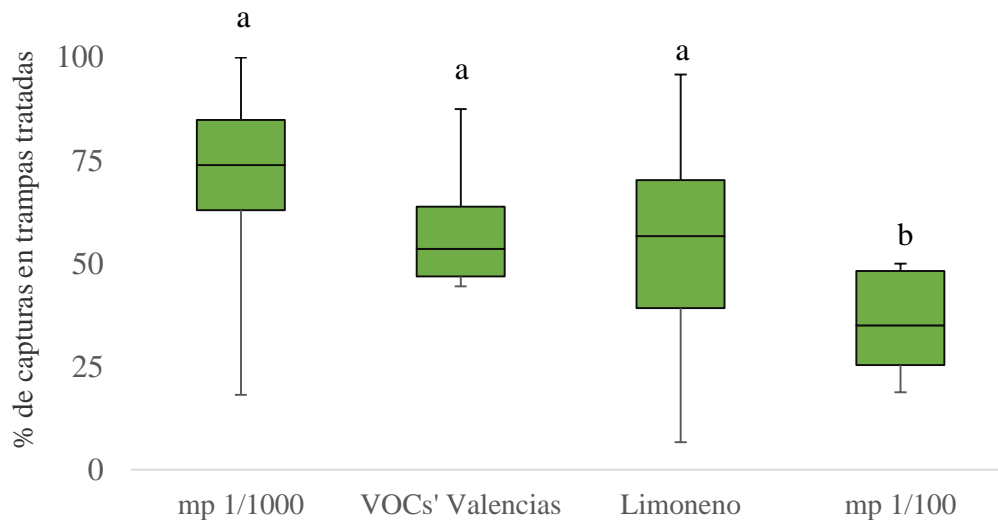


Figura 7. Comparación entre estímulos que afectan el comportamiento de *D. citri*. Los resultados se expresan como porcentaje de insectos capturados a las 24 h en trampas tratadas. Las cajas indican el 1er y 3er cuartil; líneas verticales indican dispersión (máximo y mínimo). Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (GLM, Tukey-Kramer $p < 0.05$).

3.6. DISCUSIÓN

Los perfiles globales de las especies cítricas estudiadas presentan similitudes y diferencias a los resultados reportados por otros autores utilizando metodologías similares (Patt y Setamou, 2010) (Robbins et al., 2012), las variaciones podrían ser atribuidas a la genética y ambiente (suelo, manejo, clima) (Lota et al., 2002). Tal como ha sido reportado por Patt y Setamou (2010), los perfiles de todas las especies se componen principalmente por monoterpenos hidrocarburos. Estos autores han reportado también monoterpenos oxigenados y sesquiterpenos hidrocarburos como compuestos mayoritarios, nuestros resultados muestran importantes cantidades de monoterpenos oxigenados y en menor proporción sesquiterpenos hidrocarburos. Un

resultado novedoso son las grandes cantidades de antranilatos de metilo encontradas, principalmente metil antranilato de metilo, el cual no ha sido reportado en colectas de volátiles *in vivo*, pero si en aceites esenciales de cítricos obtenidos con otros procesos extractivos (Aragão da Hora Almeida et al., 2015); los mismos no fueron compuestos mayoritarios en todas las especies estudiadas. Es relevante señalar que estos resultados no proveen de información cuantitativa, las comparaciones en proporciones de cada compuesto solo pueden hacerse intra-especie. Como trabajo futuro puede ser de interés la utilización de estándares internos para comparaciones cuantitativas entre especies.

Estos resultados no permiten establecer correlaciones causa-efecto entre volátiles y la preferencia de oviposición reportada, dado que los reportes de preferencia provienen de observaciones de la biología del insecto en distintos hospederos, donde no se aíslan los estímulos olfativos del resto de los estímulos (Alves et al., 2014; Buenahora et al., 2015; Liu y Tsai, 2000; Pereira das Neves et al., 2015a; Pereira das Neves et al., 2015b; Sétamou et al., 2008). Sin embargo se presentan observaciones de interés:

- Los perfiles mostraron complejidades diferenciales. La cantidad total de compuestos fue de 35 en el perfil de limón ‘Cravo’, 34 en cidro, 28 en naranja dulce, 23 en Limón ‘Eureka’, 12 en limón rugoso y 9 en pomelo Duncan, no siendo la complejidad de los perfiles de volátiles un factor común de las especies reportadas previamente como preferidas (Buenahora et al., 2015). De hecho pomelo Duncan, la especie preferida, presentó el perfil más simple y limón ‘Cravo’ y cidro, especies de menor preferencia, perfiles mucho más complejos.
- El PCA agrupó los perfiles de VOCs de las especies potencialmente preferidas (Buenahora et al., 2015), principalmente por ser conformados en mayor medida por limoneno y metil antranilato de metilo. Esto puede entenderse como una

prueba más de la relevancia de estos estímulos en la elección del hospedero por *D. citri*.

En cuanto a la evaluación de atrayentes, se observó que dentro de los estímulos que resultaron atrayentes, las trampas tratadas con MP 1/1000 capturaron en promedio 2.0 veces más adultos que la trampa sin tratar, la colecta de Valencia 1.5 y limoneno 1.4. No hubo diferencias significativas entre estímulos, probablemente debido a la gran variabilidad observada (Figura 7). Si bien los resultados globales probaron que la MP 1/1000 y el limoneno resultaron atrayentes, se observaron oportunidades donde el efecto fue invertido, tal como se observa en las desviaciones estándar (Figura 7), por lo que estas mezclas no resultan atrayentes suficientemente poderosos para ser aplicados como tales, sin embargo resulta prometedor el hecho de haber logrado obtener mezclas atrayentes sintéticas en base al perfil volátil natural determinado para pomelo Duncan, sobre lo que se puede continuar investigando.

El hecho que los VOCs (colecta Valencia) presentasen la menor desviación estándar al ser evaluados como atrayentes (Figura 7) y que la MP a mayor concentración resultó repelente, es una señal de la importancia de la composición y concentración en el estímulo olfativo. A su vez, el hecho de que la MP artificial y su componente mayoritario no presentaron diferencias significativas a los volátiles naturales, es un resultado alentador ya que se podría eventualmente mejorar la atracción de las trampas amarillas utilizando un solo compuesto como atrayentes.

El metil antranilato de metilo no mostró ningún efecto significativo a ninguna de las concentraciones observadas, pero sigue siendo remarcable el hecho de que las especies potencialmente preferidas presentaran grandes cantidades de este compuesto a diferencia de las menos preferidas. Quizás este compuesto podía estar relacionado con la preferencia en un marco de integración de estímulos, presentando un efecto sinérgico con los mismos.

Estos resultados muestran la complejidad del comportamiento de *D. citri* y en particular la dificultad de trabajar con la modificación de su comportamiento. Estos inconvenientes son comunes en los numerosos estudios relacionados a la temática y de

hecho hasta el momento, no se han logrado aplicaciones eficientes de la ecología química de este insecto en estrategias de manejo (Godfrey et al., 2013; Grafton-Cardwell et al., 2013; Yan et al., 2015). Esto puede estar relacionado a la simplicidad de las antenas del psílido (Onagbola et al., 2008), lo que puede resultar en que no se den comportamientos mediados por claves químicas complejas. La respuesta pobre a VOCs ha sido reportada para otras especies de psílidos (Steinbauer, 2016). Estos resultados también reafirman la importancia de la integración de claves visuales, que mejorarían la utilización de semioquímicos en el manejo de *D. citri*. Claramente, la integración de estímulos en la orientación de este insecto es fundamental (Patt et al., 2011; Stockton et al., 2016). De este modo, el uso combinado de atrayentes y repelentes en el contexto de estrategias de tipo *push and pull*, donde el material vegetal proveería el resto de los estímulos necesarios para desencadenar las respuestas en el comportamiento de *D. citri*, o la utilización de genotipos que difieran en atracción naturalmente, parecerían ser estrategias más acertadas para este insecto, en lugar de aspirar a la manipulación del insecto a través de claves solamente olfativas o visuales.

Del mismo modo, los estudios de preferencia por hospederos deben ser integradores, teniendo en cuenta claves químicas y físicas fijas en los brotes, junto con VOCs. Como trabajo futuro, una línea de investigación interesante relacionada a este tema, es el estudio en paralelo de la preferencia de *D. citri*, las emisiones de volátiles y la química de los brotes de variedades de cítricas de interés para la citricultura en Uruguay, para poder comparar los resultados de las mismas plantas, en las mismas condiciones.

3.7. CONCLUSIONES

Este trabajo permitió conocer los perfiles de volátiles de 6 variedades cítricas sobre las que existían estudios previos de preferencia. Los perfiles de las especies reportadas como preferidas fueron similares entre ellos y se separaron de las especies menos preferidas, especialmente por su contenido de limoneno y metil antranilato de

metilo. Se logró obtener una mezcla sintética simple atrayente a partir del perfil determinado para pomelo Duncan que no se diferenció significativamente de su compuesto mayoritario, limoneno. Estos resultados muestran que los perfiles de volátiles de hospederos óptimos son una buena fuente para el desarrollo de potenciales estímulos olfativos y que la utilización conjunta de trampas amarillas y volátiles podría mejorar la eficiencia en las capturas de las mismas.

3.8. BIBLIOGRAFÍA

- Adams R. 2007. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation Illinois: Carol Stream. 804p.
- Alves GR, Diniz AJF, y Parra JRP. 2014. Biology of the huanglongbing vector *Diaphorina citri* (Hemiptera:Liviidae) on different host plants. Journal of Economic Entomology, 107: 691-696.
- Amuedo S. 2010. Abundancia y agregación de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). [Tesis de doctorado]. Montevideo, Uruguay: Facultad de Agronomía, Universidad de la República. p.
- Aragão da Hora Almeida L, Zanutelli Santos J, dos Santos Soares-Filho W, Ribeiro Bizzo H, Padilha Silva J, y Fontes Vieira R. 2015. Chemical characterization of leaf essential oil from seven accessions of sour orange (*Citrus aurantium* L.). Journal of Essential Oil Bearing Plants, 18: 426-435.
- Buenahora J, Pereira das Neves V, Franco J, Galván V, y Amorós M. 2015. Preferencia de oviposición de *Diaphorina citri*, con chance de elección en círculos, en 6 especies de cítricos. En: VIII Congreso Argentino de Citricultura (2015, Bella Vista, Corrientes). 117-118.
- Cook SM, Khan ZR, y Pickett JA. 2007. The Use of Push-Pull Strategies in Integrated Pest Management. Annual Review of Entomology, 52: 375-400.

- Chan Teck S, Fatimah A, Beattie A, Heng R, y King W. 2011. Influence of Host Plant Species and Flush Growth Stage on the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 6 536-543.
- Godfrey KE, Galindo C, Patt JM, y Luque-Williams M. 2013. Evaluation of color and scent attractants used to trap and detect Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae) in urban environments. Florida Entomologist, 96: 1406-1416.
- González A, Calvo MV, Cal V, Hernández V, Doño F, Alves L, Gamenara D, Rossini C, y Martínez G. 2012. A Male Aggregation Pheromone in the Bronze Bug, *Thaumastocoris peregrinus* (Thaumastocoridae). Psyche, 2012: 1-7.
- Grafton-Cardwell EE, Stelinski LL, y Stansly PA. 2013. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. Annual Review of Entomology, 58: 413-432.
- Halbert SE, y Manjunath KL. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. Florida Entomologist, 87: 330-353.
- Liu YH, y Tsai JH. 2000. Effects of temperature and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). . Annals of Applied Biology, 137: 201-6.
- Lota ML, De Rocca Serra D, Tomi F, Jacquemond C, y Casanova J. 2002. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 796–805.
- Mann RS, Ali JG, Hermann SL, Tiwari S, Pelz-Stelinski KS, Alborn HT, y Stelinski LL. 2012. Induced release of a plant-defense volatile ‘deceptively’ attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. PLoS Pathogens, 8: e1002610.
- Mann RS, Rouseff RL, Smoot JM, Castle WS, y Stelinski LL. 2011. Sulfur volatiles from *Allium* spp. affect Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama

- (Hemiptera: Psyllidae), response to citrus volatiles. *Bulletin of Entomological Research*, 101: 89-97.
- Martini X, Kuhns EH, Hoyte A, y Stelinski L. 2014. Plant volatiles and density-dependent conspecific odors are used by asian citrus psyllid to evaluate host suitability on a spatial scale. *Arthropod-Plant Interactions*, 8: 453-460.
- Miranda MP, dos Santos FL, Bassanezi RB, Montesino LH, Barbosa JC, y Sétamou M. 2017. Monitoring methods for *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) on citrus groves with different insecticide application programmes. *Journal of Applied Entomology*, 00: 1-8.
- NIST Mass Spec Data Center. 2017. Mass Spectra. En: Linstrom PJ y Mallard WG. (Eds.). NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69. Gaithersburg MD: National Institute of Standards and Technology.
- Onagbola EO, Meyer WL, Boina DR, y Stelinski LL. 2008. Morphological characterization of the antennal sensilla of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), with reference to their probable functions. *Micron*, 39: 1184-1191.
- Patt JM, Meikle WG, Mafra-Neto A, Sétamou M, Mangan R, Yang C, Malik N, y Adamczyk JJ. 2011. Multimodal Cues Drive Host-Plant Assessment in Asian Citrus Psyllid (*Diaphorina citri*). *Environmental Entomology*, 40: 1494-1502.
- Patt JM, y Setañou M. 2010. Responses of the asian citrus psyllid to volatiles emitted by the flushing shoots of its rutaceous host plants. *Environmental Entomology*, 39: 618-624.
- Pereira das Neves V, Buenahora J, Franco J, Galván V, y Amorós ME. 2015a. Estudio de la preferencia de oviposición de *Diaphorina citri*, con chance de elección, en 6 especies de cítricos. En: VIII Congreso Argentino de Citricultura (2015, Bella Vista, Corrientes). 148.
- Pereira das Neves V, Buenahora J, Jorge F, Galván V, y Amorós ME. 2015b. Evaluación de la preferencia de oviposición y emergencia de adultos de

- Diaphorina citri*, sin chance de elección, en 6 especies de cítricos. En: VIII Congreso Argentino de Citricultura (2015, Bella Vista, Corrientes). 149-150.
- Robbins PS, A. RT, Stelinski LL, y Lapointe SL. 2012. Volatile profiles of young leaves of rutaceae varying the susceptibility to the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist*, 95: 774-776.
- RStudioTeam. 2015. RStudio: Integrated Development for R. RStudio. Disponible en: <http://www.rstudio.com/>.
- Sétamou M, Sanchez A, Patt JM, Nelson S, Jifon J, y Louzada E. 2012. Diurnal patterns of flight activity and effects of light on host finding behavior of the Asian citrus psyllid. *Journal of Insect Behavior*, 25: 264–276.
- Sétamou M, Flores D, French JV, y Hall DG. 2008. Dispersion patterns and sampling plans for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in citrus. *Journal of Economic Entomology*, 101: 1478-1487.
- Steinbauer MJ. 2016. Effects of eucalypt nutritional quality on the bog gum-victorian metapopulation of *Ctenarytaina bipartita* and implications for host and range expansion. *Ecological Entomology*, 41: 211-225.
- Stockton DG, Martini X, Patt JP, y Stelinski LL. 2016. The influence of learning on host plant preference in a significant phytopathogen vector, *Diaphorina citri*. *PLoS ONE*, 11: e0149815.
- Wenninger EJ, Stelinski LL, y Hall DG. 2009. Roles of olfactory cues, visual cues, and mating status in orientation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) to four different host plants. *Environmental Entomology*, 38: 225-234.
- Yan H, Jiwu Zeng J, y Zhonga G. 2015. The push–pull strategy for citrus psyllid control. *Pest Management Science*, 71: 893-896.

3.9. ANEXO – Detalle de compuestos orgánicos volátiles en las especies cítricas estudiadas.

tr	compuesto	IR		tipo de compuesto	Limón Cravo		Pomelo Duncan		Limón rugoso		Limón Eureka		Cídro		Naranja dulce	
		rep.	calc.		media ± ee	min - máx	media ± ee	min - máx	media ± ee	min - máx	media ± ee	min - máx	media ± ee	min - máx	media ± ee	min - máx
8,20	alfa-pineno	932	929	MT	-	-	-	-	-	-	0,3 ± 0,1	0,0 - 0,6	-	-	-	-
9,35	sabineno	969	973	MT	5,2 ± 0,9	2,1 - 7,6	1,1 ± 0,6	0,0 - 2,5	6,3 ± 0,8	3,4 - 9,1	0,1 ± 0,1	0,0 - 0,6	-	-	2,0 ± 0,4	0,6 - 3,5
9,45	beta-pineno	974	977	MT	11 ± 2	3 - 17	0,3 ± 0,1	0,0 - 0,6	-	-	0,2 ± 0,2	0,0 - 1,2	-	-	0,16 ± 0,09	0,00 - 0,58
9,72	6-metil-5-hepten-2-ona	981	986	cetona	0,18 ± 0,09	0,00 - 0,52	-	-	-	-	-	-	0,7 ± 0,3	0,2 - 1,9	-	-
9,85	beta-mirceno	988	992	MT	2,3 ± 0,3	1,5 - 3,2	-	-	0,5 ± 0,3	0,0 - 1,6	0,5 ± 0,3	0,0 - 1,7	4 ± 1	1 - 8	1,0 ± 0,1	0,8 - 1,5
9,93	mesitileno	994	995	aromático	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2 ± 0,1	0,0 - 0,8
10,44	delta-careno	1008	1012	MT	-	-	-	-	-	-	1,0 ± 0,4	0,0 - 2,8	-	-	10 ± 9	0 - 57
10,87	beta-cimeno	1020	1025	MT	-	-	0,5 ± 0,3	0,0 - 1,6	-	-	0,5 ± 0,5	0,0 - 2,8	-	-	-	-
11,07	limoneno	1024	1031	MT	40 ± 3	30 - 45	67 ± 6	51 - 89	54 ± 3	42 - 63	45 ± 5	22 - 61	53 ± 5	38 - 73	41 ± 10	0 - 65
11,11	cineol	1026	1032	MT oxig	9 ± 3	3 - 18	-	-	3 ± 1	0 - 7	6 ± 2	0 - 13	0,7 ± 0,6	0,0 - 3,8	-	-
11,25	(E)-beta-ocimeno	1044	1039	MT	0,9 ± 0,5	0,0 - 2,6	7 ± 5	0 - 24	-	-	0,08 ± 0,08	0,00 - 0,46	0,4 ± 0,3	0,0 - 1,3	0,6 ± 0,5	0,1 - 3,0
11,57	sesquiterpeno hidrocarburo	x	x	MT	6 ± 1	3 - 10	-	-	1,6 ± 0,2	0,9 - 2,4	4,2 ± 0,7	1,2 - 6,0	0,5 ± 0,4	0,0 - 2,6	2,2 ± 0,8	0,6 - 5,8
11,57	(E)-tujona	1112	1119	MT oxig	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3 ± 0,7	0,7 - 4,8	0,07 ± 0,07	-
11,89	gamma-terpineno	1054	1061	MT	-	-	-	-	-	-	0,6 ± 0,5	0,0 - 3,0	1,6 ± 0,4	0,7 - 2,7	1,1 ± 0,2	0,7 - 1,9
12,14	hidrato de sabineno	1065	1068	MT oxig	0,09 ± 0,05	0,00 - 0,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,08	linalool	1095	1101	MT oxig	1,8 ± 0,5	1,0 - 3,9	-	-	-	-	1,4 ± 0,9	0,0 - 5,6	1,5 ± 0,3	0,8 - 2,6	0,6 ± 0,2	0,0 - 1,0
13,09	carvone	1239	1248	MT oxig	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,18 ± 0,04	0,05 - 0,36

13,22	nonanal	1110	1106	aldehído	-	-	-	-	-	-	-	-	5 ± 2	0 - 13	0,3 ± 0,3	0,0 - 1,7
13,58	NI	1454	x	NI	1,7 ± 0,5	0,5 - 2,8	0,6 ± 0,4	0,0 - 2,0	0,6 ± 0,3	0,0 - 2,1	19 ± 9	1 - 60	-	-	-	-
13,73	cis-p-mentha- 2,8-dien-1-ol	1119	1123	MT oxig	-	-	-	-	0,6 ± 0,4	0,6 - 2,1	-	-	-	-	-	-
13,97	alloocimeno	1128	1131	MT	0,6 ± 0,4	0 - 1,9	-	-	-	-	-	-	0,10 ± 0,09	0,00 - 0,54	-	-
14,12	monoterpeno oxigenado	x	x	MT oxig	0,2 ± 0,1	0,0 - 0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14,13	cis óxido de limoneno	1132	1136	MT oxig	-	-	-	-	-	-	-	-	0,06 ± 0,05	0,00 - 0,30	-	-
14,25	trans óxido de limoneno	1137	1141	MT oxig	0,4 ± 0,2	0,0 - 1,0	-	-	0,2 ± 0,1	0,0 - 0,7	-	-	0,2 ± 0,2	0,0 - 1,3	0,30 ± 0,06	0,11 - 0,48
14,66	beta-citronellal	1148	1155	MT oxig	4 ± 2	1 - 12	-	-	-	-	3 ± 2	0 - 10	1,0 ± 0,8	0,0 - 4,6	-	-
15,33	aromático	x	x	aromatico	0,13 ± 0,09	0,00 - 0,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15,80	alfa-terpineol	1186	1193	MT oxig	1,3 ± 0,4	0,5 - 2,5	-	-	-	-	-	-	0,06 ± 0,04	0,03 ± 0,03	0,00 - 0,18	
16,00	dodecano	1235	1200	hidrocarburo	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,0 - 1,2	
16,18	decanal	1201	1206	aldehído	-	-	-	-	-	-	-	-	3,01 ± 1	1,9 ± 0,6	0,1 - 3,8	
16,62	sabineno	1226	1223	MT oxig	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05 ± 0,05	0,00 - 0,29
16,72	monoterpeno hidrocarburo	x	x	MT	0,3 ± 0,2	0,0 - 1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16,83	nerol	1227	1231	MT oxig	0,3 ± 0,2	0,0 - 0,8	-	-	-	-	0,7 ± 0,4	0,0 - 2,0	0,2 ± 0,2	0,0 - 1,4	-	-
16,84	beta-citronellol	1233	1232	MT oxig	-	-	-	-	-	-	0,8 ± 0,4	0,0 - 2,6	0,2 ± 0,2	0,0 - 1,3	-	-
17,20	neral	1235	1244	MT oxig	0,6 ± 0,2	0,2 - 1,4	-	-	-	-	2 ± 1	0 - 8	1,3 ± 0,9	0,0 - 5,3	-	-
17,56	geraniol	1249	1256	MT oxig	0,05 ± 0,03	0,00 - 0,15	-	-	-	-	0,1 ± 0,1	0,0 - 0,6	0,1 ± 0,1	0,0 - 0,9	-	-
17,76	(E)-decenal	1260	1264	aldehído	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5 ± 0,8	0,0 - 4,9	0,9 ± 0,3	0,2 - 2,1

18,05	geranial	1264	1274	MT oxig	0,6 ± 0,4	0,00 - 2,23	-	-	-	-	4 ± 2	0 - 13	2 ± 1	0 - 7	-	-
18,54	acetato de bornilo	1287	1294	MT oxig	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2 ± 0,2	0,0 - 1,2	0,22 ± 0,07	0,00 - 0,46
18,78	tridecano	1300	1303	hidrocarburo	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2 ± 0,2	0,0 - 1,0	0,22 ± 0,06	0,08 - 0,41
19,00	undecanal	1305	1311	aldehído	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2 ± 0,1	0,0 - 0,8	-	-
19,90	delta-elemeno	1335	1342	ST	0,08 ± 0,04	0,00 - 0,21	-	-	0,6 ± 0,2	0,3 - 1,7	-	-	-	-	0,15 ± 0,07	0,00 - 0,39
20,20	metil antranilato	1334	1349	antranilato de metilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4 ± 0,2	0,0 - 1,0
20,22	acetato de citronelilo	1350	1355	MT oxig	0,20 ± 0,08	0,00 - 0,44	-	-	-	-	-	-	0,4 ± 0,3	0,0 - 1,5	-	-
20,52	2-undecenal	1357	1366	aldehído	-	-	-	-	-	-	0,2 ± 0,2	0,0 - 0,9	1,4 ± 0,6	0,0 - 4,3	0,6 ± 0,3	0,0 - 1,5
20,89	cetona	x	x	cetona	-	-	-	-	0,8 ± 0,7	0,0 - 4,5	-	-	-	-	-	-
21,02	acetato de geranilo	1379	1386	MT oxig	-	-	-	-	-	-	1,5 ± 0,8	0,0 - 5,2	0,3 ± 0,3	0,0 - 1,7	-	-
21,31	beta-cubebeno	1387	1393	ST	0,20 ± 0,09	0,00 - 0,38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21,43	alcano	x	x	alcano	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0 ± 0,5	0,0 - 3,2	0,2 ± 0,2	0,0 - 1,1
21,75	metil antranilato de metilo	1405	1415	antranilato de metilo	1,5 ± 0,7	0,2 - 4,3	21 ± 5	6 - 35	27 ± 3	16 - 35	8 ± 4	1 - 24	15 ± 6	0 - 34	33 ± 5	18 - 48
22,11	cariofileno	x	x	ST	4,6 ± 0,9	2,3 - 6,7	2,0 ± 0,6	0,6 - 3,9	5,1 ± 0,6	3,4 - 6,6	1,0 ± 0,2	0,5 - 1,9	1,3 ± 0,3	0,3 - 2,3	1,6 ± 0,3	0,6 - 2,5
22,45	sesquiterpeno hidrocarburo	x	x	ST	1,5 ± 0,5	0,4 - 2,8	-	-	-	-	-	-	0,2 ± 0,1	0,0 - 0,8	-	-
22,97	sesquiterpeno hidrocarburo	x	x	ST	0,2 ± 0,1	0,0 - 0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23,63	sesquiterpeno hidrocarburo	x	x	ST	0,30 ± 0,15	0,00 - 0,70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

24,10	sesquiterpeno hidrocarburo	x	x	ST	3,6 ± 0,7	1,1 - 5,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24,15	sesquiterpeno hidrocarburo	x	x	ST	1,5 ± 0,5	0,0 - 2,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24,50	sesquiterpeno hidrocarburo	x	x	ST	0,20 ± 0,09	0,00 - 0,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25,18	(E)-Nerolidol	1561	1571	ST oxig	0,2 ± 0,1	0,0 - 0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25,45	sesquiterpeno hidrocarburo	x	x	ST	0,3 ± 0,2	0,0 - 0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21,34	sesquiterpeno hidrocarburo	x	x	ST	-	-	1,0 ± 0,6	0,0 - 2,5	-	-	-	-	-	0,09 ± 0,06	0,00 - 0,30

Los resultados se expresan como % de área relativa ± desviación estándar. – = compuesto no presente en la muestra, NI = compuesto no identificado, MT = monoterpeno, MT oxig = monoterpeno oxigenado, ST = sesquiterpeno, ST oxig= sesquiterpeno oxigenado, x = no corresponde. IR = índice de retención, tr = tiempo de retención, rep. = reportado, calc. = calculado.

4. CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo permitió delinear medidas de manejo de este insecto en el corto y largo plazo, con distintos niveles de aplicabilidad.

Rápidamente aplicable es la selección de insecticidas viables de ser utilizados en el contexto de la citricultura uruguaya. Los resultados de los experimentos en condiciones controladas y campo demuestran consistentemente que los aceites resultan una herramienta interesante para un manejo integrado de la plaga, que proveen un control integral a corto plazo, con baja acción residual, presentando bajo impacto para insectos benéficos, baja toxicidad en mamíferos, sin riesgo de generación de resistencia de la plaga y sin dejar residuos en fruta. La abamectina, el spirotetramat y los aceites de neem resultan alternativas aplicables para la rotación de productos. A su vez estos productos son utilizados para el manejo de otras plagas cítricas comunes.

A su vez, este trabajo permitió conocer los perfiles de volátiles de 6 variedades cítricas con distinta preferencia del insecto. Los perfiles de las especies reportadas como preferidas fueron similares entre ellos y se separaron de las especies menos preferidas, especialmente por su contenido de limoneno y metil antranilato de metilo. Se logró obtener una mezcla sintética simple, atrayente a partir del perfil determinado para pomelo Duncan que no se diferenció significativamente de su compuesto mayoritario, limoneno. Se puede concluir que los perfiles de volátiles de hospederos óptimos son una buena fuente para el desarrollo de potenciales estímulos olfativos y que la utilización conjunta de trampas amarillas y volátiles podría mejorar la eficiencia en las capturas de las mismas. Estos resultados son aportes útiles para continuar investigando en esta línea, con una aplicabilidad a largo plazo.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah TL, Shokrollah H, Sijam K, y Abdullah SNA. 2009. Control of huanglongbing (HLB) disease with reference to its occurrence in Malaysia. *African Journal of Biotechnology*, 8: 4007-4015.
- Adams R. 2007. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation Illinois: Carol Stream. 804p.
- Alves GR, Diniz AJF, y Parra JRP. 2014. Biology of the huanglongbing vector *Diaphorina citri* (Hemiptera:Liviidae) on different host plants. *Journal of Economic Entomology*, 107: 691-696.
- Amuedo S. 2010. Abundancia y agregación de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). [Tesis de doctorado]. Montevideo, Uruguay: Facultad de Agronomía, Universidad de la República. p.
- Aragão da Hora Almeida L, Zanotelli Santos J, dos Santos Soares-Filho W, Ribeiro Bizzo H, Padilha Silva J, y Fontes Vieira R. 2015. Chemical characterization of leaf essential oil from seven accessions of sour orange (*Citrus aurantium* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18: 426-435.
- Asplanato G, Pazos J, Buenahora J, Amuedo S, Rubio L, y Franco J. 2011. El psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae): Primeros estudios bioecológicos en Uruguay. Serie FPTA N° 28. Montevideo: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). 48p.
- Asplanato G. 2009. El minador de la hoja de los cítricos, *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae): Bioecología y control biológico. Serie FPTA, N° 24. Montevideo: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). 62p.
- Bell J, Krueger S, y Steffens R. 2008. Development of Movento™ for sucking pest control on annual and perennial crops in the United States. *Bayer CropScience Journal*, 61. Monheim am Rhein: Bayer CropScience AG. 315-328.

- Bernal R. 1991. *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) nuevo insecto detectado en montes cítricos en el área de Salto, Uruguay. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Hoja de Divulgación: 1p.
- Boina DR, y Bloomquist JR. 2015. Chemical control of the Asian citrus psyllid and of huanglongbing disease in citrus. *Pest Management Science*, 71: 808-823.
- Boina DR, Youn Y, Folimonova S, y Stelinski LL. 2011. Effects of pymetrozine, an antifeedant of Hemiptera, on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, feeding behavior, survival and transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Pest Management Science*, 67: 146-155.
- Boina DR, Rogers ME, Wang N, y Stelinski LL. 2010. Effect of pyriproxyfen, a juvenile hormone mimic, on egg hatch, nymph development, adult emergence and reproduction of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. *Pest Management Science*, 66: 349-357.
- Boina DR, Onagbola EO, Salyani M, y Stelinski LL. 2009. Antifeedant and sublethal effects of imidacloprid on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Pest Management Science*, 65: 870-877.
- Bové JM. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88: 7-37.
- Brück E, Elbert A, Fischer R, Krueger S, Kühnhold J, Klueken AM, Nauen R, Niebes J, Reckmann U, Schnorbach H, Steffens R, y Waetermeulen X. 2009. Movento, an innovative ambimobile insecticide for sucking insect pest control in agriculture: Biological profile and field performance. *Crop Protection*, 28: 838-844.
- Buenahora J, Pereira das Neves V, Galván V, Amorós M, Rodríguez A, y Amaral J. 2016. Manejo integrado de *Diaphorina citri* con énfasis en control biológico. Serie de actividades de difusión N° 769, Salto, Uruguay: INIA Salto Grande. 44p.
- Buenahora J, Pereira das Neves V, Franco J, Galván V, y Amorós M. 2015. Preferencia de oviposición de *Diaphorina citri*, con chance de elección en

- círculos, en 6 especies de cítricos. En: VIII Congreso Argentino de Citricultura (2015, Bella Vista, Corrientes). 117-118.
- Burckhardt D. 1994. Generic key to Chilean jumping plant-lice (Homoptera: Psylloidea) with inclusion of potential exotic pests. *Revista Chilena de Entomología*, 21: 57-67.
- Caletta-Filho HD, Tagon MLPN, Takita MA, De Negri JD, Pompeu JJ, y Machado MA. 2004. First report of causal agent of huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in Brazil. *Plant Disease*: 88:1382.
- Cocco A, y Hoy M. 2008. Toxicity of organosilicone adjuvants and selected pesticidicides to the Asian citrus psyllid (Hemiptera:Psyllidae) and its parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). *Florida Entomologist*, 91: 610-620.
- Cook SM, Khan ZR, y Pickett JA. 2007. The Use of Push-Pull Strategies in Integrated Pest Management. *Annual Review of Entomology*, 52: 375-400.
- Correa Signoretti AG. 2014. Identificación de volátiles de plantas de citrus con potencial para uso en el manejo integrado de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera:Liviidae). [Tesis de doctorado]. Piracicaba: Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 77p.
- Costa Lima AM. 1942. Hompteros, Insetos do Brasil. Río de Janeiro: Oficinas de obras do Jornal do commercio. 327p.
- Chan Teck S, Fatimah A, Beattie A, Heng R, y King W. 2011. Influence of Host Plant Species and Flush Growth Stage on the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6 536-543.
- Davidson NA. 1991. Managing Insects and Mites with Spray Oils. IPM Education and Publications, Statewide Integrated Pest Management, Publication 3347. Oakland, California: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. 44p.

- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, y Robledo CW. 2011. InfoStat. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar/>.
- Godfrey KE, Galindo C, Patt JM, y Luque-Williams M. 2013. Evaluation of color and scent attractants used to trap and detect Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae) in urban environments. *Florida Entomologist*, 96: 1406-1416.
- González A, Calvo MV, Cal V, Hernández V, Doño F, Alves L, Gamenara D, Rossini C, y Martínez G. 2012. A Male Aggregation Pheromone in the Bronze Bug, *Thaumastocoris peregrinus* (Thaumastocoridae). *Psyche*, 2012: 1-7.
- Gottwald TR, da Graca JV, y Bassanezi RB. 2007. Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, 6: 1-18.
- Gottwald TR, y Dixon T. 2006. Florida Actions Toward HLB Control. En: International Workshop on Citrus Greening (2006, Ribeirão Preto, São Pablo). Proceedings of the Huanglongbing. Araraquara, São Pablo. Fundecitrus. 67-68.
- Grafton-Cardwell EE, Stelinski LL, y Stansly PA. 2013. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. *Annual Review of Entomology*, 58: 413-432.
- Halbert SE. 2005. The discovery of huanglongbing in Florida. En: International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop (2º, 2005, Orlando, Florida). Proceedings. Orlando, Florida. Florida Citrus Mutual. 50.
- Halbert SE, y Manjunath KL. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist*, 87: 330-353.
- Hall DG, Lapointe SL, y Wenninger EJ. 2007. Effects of a particle film on biology and behavior of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and its infestations in citrus. *Journal of Economic Entomology*, 100: 847-854.
- Horton DR. 1999. Monitoring of pear psylla for pest management decisions and research. *Integrated Pest Management Reviews* 4: 1-20.

- Kim JS, Sagaram US, Burns JK, Li JL, y Wang N. 2009. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection: microscopy and microarray analyses. *Phytopathology*, 99: 50-57.
- Liu YH, y Tsai JH. 2000. Effects of temperature and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). . *Annals of Applied Biology*, 137: 201-6.
- Lizondo M, Martínez D, Pérez D, Augier L, y Gastaminza G. 2014. Eficacia de Harrier en el control de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) en cítricos del noroeste argentino. En: IV Simposio Nacional y I Congreso Latinoamericano de Citricultura (2014, Salto, Uruguay).
- Lota ML, De Rocca Serra D, Tomi F, Jacquemond C, y Casanova J. 2002. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 796–805.
- Mann RS, Tiwari S, Smoot JM, Rouseff RL, y Stelinski LL. 2012a. Repellency and toxicity of plant-based essential oils and their constituents against *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Applied Entomology*, 136: 87-96.
- Mann RS, Ali JG, Hermann SL, Tiwari S, Pelz-Stelinski KS, Alborn HT, y Stelinski LL. 2012b. Induced release of a plant-defense volatile ‘deceptively’ attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. *PLoS Pathogens*, 8: e1002610.
- Mann RS, Rouseff RL, Smoot JM, Castle WS, y Stelinski LL. 2011. Sulfur volatiles from *Allium* spp. affect Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), response to citrus volatiles. *Bulletin of Entomological Research*, 101: 89-97.
- Mann RS, Qureshi JA, Stansly PA, y Stelinski LL. 2010. Behavioral response of *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) to volatiles emanating from *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) and citrus. *Journal of Insect Behavior*, 23: 447-458.

- Martini X, Kuhns EH, Hoyte A, y Stelinski L. 2014. Plant volatiles and density-dependent conspecific odors are used by asian citrus psyllid to evaluate host suitability on a spatial scale. *Arthropod-Plant Interactions*, 8: 453-460.
- MGAP-DGSA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Servicios Agrícolas, Uruguay). 2016. Registro de productos fitosanitarios [En línea]. Consultado 7 diciembre 2016. Disponible en: <https://www.mgap.gub.uy/profit/wwproductos.aspx>.
- MGAP-DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, Uruguay). 2016. Anuario Estadístico Agropecuario [En línea]. Consultado 16 mayo 2017. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016>.
- Miranda MP, dos Santos FL, Bassanezi RB, Montesino LH, Barbosa JC, y Sétamou M. 2017. Monitoring methods for *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) on citrus groves with different insecticide application programmes. *Journal of Applied Entomology*, 00: 1-8.
- Monzó C, Vanaclocha P, y Stansly PA. 2014a. Gestión del HLB y de su vector, el psílido asiático de los cítricos en Florida Levante Agrícola: Revista internacional de cítricos, 421 120-125.
- Monzó C, Qureshi JA, y Stansly PA. 2014b. Insecticide sprays, natural enemy assemblages and predation on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Bulletin of Entomological Research*, 104: 576-585.
- Nauen R, Reckmann U, Thomzik J, y Thielert W. 2008. Biological profile of spirotetramat (Movento) - a new two-way systemic (ambimobile) insecticide against sucking pest species. *Bayer CropScience Journal*, 61. Monheim am Rhein: Bayer CropScience AG. 403-436.
- Nava DE, Torres MLG, Rodrigues MDL, Bento JMS, y Parra JRP. 2007. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. *Journal of Applied Entomology*, 131: 709–715.

- NIST Mass Spec Data Center. 2017. Mass Spectra. En: Linstrom PJ y Mallard WG. (Eds.). NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69. Gaithersburg MD: National Institute of Standards and Technology.
- Onagbola EO, Rouseff RL, Smoot JM, y Stelinski LL. 2011. Guava leaf volatiles and dimethyl disulphide inhibit response of *Diaphorina citri* Kuwayama to host plant volatiles. *Journal of Applied Entomology*, 135: 404-414.
- Onagbola EO, Meyer WL, Boina DR, y Stelinski LL. 2008. Morphological characterization of the antennal sensilla of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), with reference to their probable functions. *Micron*, 39: 1184-1191.
- Outi Y, Cortese P, Santinoni L, Palma L, Agostini J, y Preusler C. 2014. HLB in Argentina: a New Disease Outbreak. *Journal of Citrus Pathology*, 1: 82.
- Ouyan G, Fang X, Lu H, Zhou X, Meng X, Yu S, Guo M, y Xia Y. 2013. Repellency of five mineral oils against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Florida Entomologist*, 96: 974-982.
- Patt JM, Meikle WG, Mafra-Neto A, Sétamou M, Mangan R, Yang C, Malik N, y Adamczyk JJ. 2011. Multimodal Cues Drive Host-Plant Assessment in Asian Citrus Psyllid (*Diaphorina citri*). *Environmental Entomology*, 40: 1494-1502.
- Patt JM, y Setárou M. 2010. Responses of the asian citrus psyllid to volatiles emitted by the flushing shoots of its rutaceous host plants. *Environmental Entomology*, 39: 618-624.
- Pechi E, Aguirre A, Cáceres S, y Asplanato G. 2016. Identificación y análisis faunístico de enemigos naturales asociados a *D. citri* (Hemiptera: Liviidae). Serie de actividades de difusión N° 769, Salto, Uruguay: INIA Salto Grande. 44p.
- Pedigo LP. 1989. *Entomology and pest management*. New York: Macmillan. 679p.

- Pereira da Silva Canettieri ER, y Garcia AH. 2000. Abundância relativa das espécies de cerambycidae (Insecta-Coleoptera) em pomar de frutíferas misto. Pesquisa Agropecuária Tropical, 30: 43-50.
- Pereira das Neves V, Buenahora J, Jorge F, Galván V, y Amorós ME. 2015a. Evaluación de la preferencia de oviposición y emergencia de adultos de *Diaphorina citri*, sin chance de elección, en 6 especies de cítricos. En: VIII Congreso Argentino de Citricultura (2015, Bella Vista, Corrientes). 149-150.
- Pereira das Neves V, Buenahora J, Franco J, Galván V, y Amorós ME. 2015b. Estudio de la preferencia de oviposición de *Diaphorina citri*, con chance de elección, en 6 especies de cítricos. En: VIII Congreso Argentino de Citricultura (2015, Bella Vista, Corrientes). 148.
- Pluke RWH, Qureshi JA, y Stansly PA. 2008. Citrus flushing patterns, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) populations and parasitism by *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Puerto Rico. Florida Entomologist, 91: 36-42.
- Quarles WI. 2013. IPM for Asian citrus psyllid and huanglongbing disease. IPM Practitioner, 34. Berkeley: Bio-Integral Resource Center (BIRC). 1-7
- Qureshi JA, y Stansly PA. 2010. Dormant season foliar sprays of broad-spectrum insecticides: An effective component of integrated management for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in citrus orchards. Crop Protection, 29: 860-866.
- Rae DJ, Liang WG, Watson DM, Beattie GAC, y Huang MD. 1997. Evaluation of petroleum spray oils for control of the Asian citrus psylla, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae), in China International Journal of Pest Management, 43: 71-75.
- Robbins PS, A. RT, Stelinski LL, y Lapointe SL. 2012. Volatile profiles of young leaves of rutaceae varying the susceptibility to the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). Florida Entomologist, 95: 774-776.
- Rogers ME, Stansly PA, Stelinski LL, y Burrow JD. 2014. Quick reference guide to citrus insecticides and miticides (ENY-854). Gainesville: University of

- Florida Institute of Food and Agricultural Sciences. Disponible en:
<https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/files/IN/IN80700.pdf>.
- Rogers ME, Stansly PA, y Stelinski LL. 2009. 2009 Florida citrus pest management guide: Asian citrus psyllid and citrus leafminer (ENY-734). Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences. Disponible en: <http://www.crec.ifas.ufl.edu/extension/greening/PDF/Huanglongbing-CitrusGreening.pdf>.
- RStudioTeam. 2015. RStudio: Integrated Development for R. RStudio. Disponible en: <http://www.rstudio.com/>.
- Sandoval-Rincón JA, Curti-Díaz SA, Díaz-Zorrilla U, Medina-Urrutia VM, y Robles-González MM. 2010. Alternativas para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos (*Diaphorina citri* Kuwayama). En: VI Simposio Internacional Cítrícola (6°, 2010, Tecomán, Colima). 154-173.
- SENASA ((Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria)). 2017. Detección de tres casos positivos de HLB en Formosa y Chaco. Consultado 30 de junio. Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar/senasa-comunica/noticias/deteccion-de-tres-casos-positivos-de-hlb-en-formosa-y-chaco>.
- SENAVE (Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas, Paraguay). 2017. El huanglongbing (HLB) de los cítricos [En línea]. Consultado 10 febrero 2017. Disponible en: <http://www.senave.gov.py/hlb.html>.
- Sétamou M, Sanchez A, Patt JM, Nelson S, Jifon J, y Louzada E. 2012. Diurnal patterns of flight activity and effects of light on host finding behavior of the Asian citrus psyllid. *Journal of Insect Behavior*, 25: 264–276.
- Sétamou M, Flores D, French JV, y Hall DG. 2008. Dispersion patterns and sampling plans for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in citrus. *Journal of Economic Entomology*, 101: 1478-1487.
- Singerman A, y Useche P. 2016. Impact of citrus greening on citrus operations in Florida (FE983). Gainesville: University of Florida, Institute of Food and

- Agricultural Sciences. Disponible en: Impact of citrus greening on citrus operations in Florida (FE983).
- Skelley LH, y Hoy M. 2004. A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. *Biological Control* 29: 14-23.
- Srinivasan R, Hoy MA, Singh R, y Rogers ME. 2008. Laboratory and field evaluations of Silwet L-77 and kinetic alone and in combination with imidacloprid and abamectin for the management of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist*, 91: 87-100.
- Steinbauer MJ. 2016. Effects of eucalypt nutritional quality on the bog gum-victorian metapopulation of *Ctenarytaina bipartita* and implications for host and range expansion. *Ecological Entomology*, 41: 211-225.
- Stockton DG, Martini X, Patt JP, y Stelinski LL. 2016. The influence of learning on host plant preference in a significant phytopathogen vector, *Diaphorina citri*. *PLoS ONE*, 11: e0149815.
- Strong L, y Brown TA. 1987. Avermectins in insect control and biology: a review. *Bulletin of Entomological Research*, 77: 357-389.
- Tansey JA, Jones MM, Vanaclocha P, Robertson J, y Stansly PA. 2015. Costs and benefits of frequent low-volume applications of horticultural mineral oil for management of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Crop Protection*, 76: 59-67.
- USDA (United States Department of Agriculture). 2017. Citrus: World Markets and Trade [En línea]. Consultado 26 junio 2017. Disponible en: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>.
- Vivanco JM, Cosio E, Loyola-Vargas VM, y Flores HE. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y ciencia*, 341. Barcelona: Prensa Científica, S.A. 68-75.
- Weathersbee AA, y McKenzie CL. 2005. Effect of a neem biopesticide on repellency, mortality, oviposition, and development of *Diaphorina citri* (Homoptera : Psyllidae). *Florida Entomologist*, 88: 401-407.

- Wenninger EJ, Stelinski LL, y Hall DG. 2009. Roles of olfactory cues, visual cues, and mating status in orientation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) to four different host plants. *Environmental Entomology*, 38: 225-234.
- Yamamoto PT, Felipe MR, Sanches AL, Coelho JHC, Garbim LF, y Ximenes NL. 2009. Eficácia de Inseticidas para o Manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em Citros. *BioAssay*, 4: 1-9.
- Yamamoto PT. 2008. Manejo integrado de pragas dos citros. Piracicaba: CP 2. 336p.
- Yan H, Jiwu Zeng J, y Zhonga G. 2015. The push–pull strategy for citrus psyllid control. *Pest Management Science*, 71: 893-896.
- Zaka SM, Zeng XN, Holford P, y Beattie GAC. 2010. Repellent effect of guava leaf volatiles on settlement of adults of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama, on citrus. *Insect Science*, 17: 39-45.
- Zhang Z, y Sanderson JP. 1990. Relative toxicity of abamectin to the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) and twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 83: 1783-1790.