

Producción de conidios en sustratos sólidos y mutación del hongo entomopatógeno *Hirsutella citrifomis* mediante metanosulfonato de etilo

Cruz-Juárez Georgina¹, Maldonado-Blanco María Guadalupe¹, De la Torre-Zavala Susana¹,
Elías-Santos Myriam¹, Rodríguez-Guerra Raúl², Sandoval-Coronado Carlos Francisco¹

¹Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán s/n Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, CP 66450.

²Instituto de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental General Terán, Carr. Montemorelos-China, Km 31, Gral. Terán, Nuevo León, México, CP 67400.

mgpemald@hotmail.com

Fecha de aceptación: 20 de julio de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

El Huanglonging (HLB) está ocasionando grandes pérdidas en cítricos causada por la bacteria *Candidatus liberibacter* y transmitida por el insecto *Diaphorina citri*. Una de las alternativas es el control del vector usando hongos entomopatógenos como *Hirsutella citrifomis*, el cual presenta algunas desventajas como su lento crecimiento y baja conidiación. En este trabajo se determinaron como objetivos, obtener alta producción de conidios en varios sustratos vegetales así como conocer la concentración y tiempos de exposición de un agente mutagénico como el metanosulfonato de etilo (MSE) sobre la cepa silvestre necesarios para generar cepas mutantes al azar que mostraran características mejoradas. *H. citrifomis* fue cultivada en dos sustratos vegetales arroz y avena y sometida a varias concentraciones de MSE y diferentes tiempos. Se obtuvo un total de 104 colonias mutantes las cuales se caracterizaron y seleccionaron en base a su velocidad de crecimiento radial, producción de conidios y germinación respecto a la cepa silvestre. Cuatro cepas mutantes fueron seleccionadas para futuros estudios.

Palabras clave: *Hirsutella citrifomis*, metanosulfonato de etilo, mutagénesis

ABSTRACT

Huanglonging disease (HLB) is causing large losses in citrus which is caused by the bacterium *Candidatus liberibacter* and transmitted by the insect *Diaphorina citri*. One alternative is the control of vector using entomopathogenic fungi as *Hirsutella citrifomis*, however this fungus has some drawbacks as slow growth and low conidiation. Therefore in this work objectives such as obtaining higher production of conidia in various plant substrates as well as to determine the concentration and exposure times of a mutagenic agent such as ethyl methane sulfonate (EMS) on the wild strain to generate mutant strains at random that showed improved features were performed. A total of 104 mutant colonies were obtained which were characterized and selected based on their rate of radial growth, conidia production and germination compared to the wild strain, these analysis allowed us to select four mutant strains for future studies including bioassays against the insect vector.

Key words: *Hirsutella citrifomis*, ethyl methanesulfonate, mutagenesis.

INTRODUCCIÓN

En nuestro país la citricultura representa, una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura. México figura como el quinto productor de cítricos en el mundo, sin embargo, en la actualidad el Huanglongbing (HLB), es una de las peores enfermedades de los cítricos que está causando grandes pérdidas a la citricultura nacional y mundial, originado por la bacteria *Candidatus liberibacter* y transmitido por el liviido *Diaphorina citri* Kuwayama (Bové, 2006). La presencia de la bacteria en México se registró en Julio de 2009 en Yucatán (SENASICA, 2009 y 2010) y a partir de allí se ha diseminado a otros estados como: Campeche, Chiapas, Colima, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Puebla, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Baja California Sur y Zacatecas (SENASICA, 2014). Una de las metodologías que ha recibido mayor atención para el control de este vector es el uso de depredadores y parasitoides (González-Hernández *et al.*, 2011) así como diversos hongos entomopatógenos como *Isaria fumosorosea* (Subandiyah *et al.*, 2000), *Beauveria bassiana* (Rivero-Aragón y Grillo-Ravelo, 2000) e *Hirsutella citriformis* (Subandiyah *et al.*, 2000; Étienne *et al.*, 2001; Cabrera *et al.*, 2004; Hall *et al.*, 2012). *Hirsutella citriformis* ha sido encontrado infectando al vector *D. citri* de forma natural (Etienne *et al.* 2001). Estos investigadores señalaron que es común observar al hongo controlando psílidos, cuando la humedad relativa era mayor del 80%. En La Habana, Cuba se detectó la presencia de un hongo sobre los adultos de *Diaphorina citri* en plantaciones de *Citrus sinensis* (L) Osbeck (naranja Valencia) y *Citrus paradisi* Macf (Toronjo) y se identificó a *Hirsutella citriformis* Speare como el responsable de un fuerte parasitismo (Cabrera *et al.*, 2004). En Tuxpan, Veracruz, México, se detectaron lúvidos adultos infectados por *Hirsutella* sp., donde la tasa de infección fue del 21.1% durante el mes de marzo (González *et al.*, 2008). *Hirsutella* es un hongo entomopatógeno, dentro de las más importantes especies está *Hirsutella citriformis* Speare (Meyer *et al.*, 2007). Sin embargo *Hirsutella citriformis* tiene como desventajas su lento crecimiento y baja producción de conidios, esto le resta ventajas en comparación con otros agentes de control biológico de más rápido crecimiento, por lo cual se necesita mejorar estas características de interés para poder utilizarse eficientemente. Los químicos como EMS han sido exitosamente usados para introducir cambios de una sola base (Ribeiro *et al.*, 2013) sin embargo, para obtener cepas competentes se debe elegir la concentración óptima de conidios, dosis y el tiempo de exposición ya que la frecuencia de mutaciones dependerá de las condiciones del tratamiento durante la mutagénesis. Para la mutación se eligió el conidio ya que es más uniforme que el micelio son los propágulos más viables empleados en programas de biocontrol y además porque se puede hacer la cuantificación. Se han estudiado distintas variables para mejorar la esporulación de hongos entomopatógenos; entre estas el uso de diferentes medios de cultivo. La mayoría de las especies de hongos son producidas en medios sólidos, donde el hongo crece como micelio superficial y produce conidios en hifas aéreas. Sustratos naturales como el arroz, trigo o avena constituyen medios de cultivo adecuados para ese propósito. En este trabajo se evaluó la producción de conidios en dos diferentes sustratos, avena y arroz, así como dos tipos de recipientes, plástico y vidrio, para determinar el más adecuado para obtener la mayor producción de conidios. Después se sometió a mutagénesis con el agente químico MSE y se determinaron las colonias mutantes sobrevivientes caracterizándolas en cuanto a crecimiento radial, producción de conidios, velocidad y porcentaje de germinación, características morfológicas y comparación con la cepa silvestre.

METODOLOGÍA

Cepa de *Hirsutella citriformis*

La cepa INIFAP-Hir 2, de *Hirsutella citriformis* originaria de Yucatán fue utilizada, obtenida de la colección del INIFAP (Campo General Terán, Nuevo León) la cual se cultivó sobre agar papa dextrosa más 1% de extracto de levadura (PDAY) durante seis semanas a temperatura de 25 ± 2 °C.

Inóculo

El inóculo empleado para la siembra en los sustratos, avena y arroz se preparó partir de un cultivo monospórico del hongo en PDAY, con abundante crecimiento de sinemas (alrededor de seis semanas), se adicionaron 10 ml de agua destilada estéril al cultivo en agar y se realizó un raspado para el desprendimiento de los conidios, la suspensión obtenida fue transferida a tubos falcon, posteriormente se tomaron 20 μ l de esta suspensión para el recuento de conidios en la cámara de Neubauer. Posteriormente se ajustó la concentración a 2.5×10^6 conidios/ml empleando agua destilada estéril. De esta suspensión se tomaron 15 ml para inocular los recipientes conteniendo el arroz y la avena, en los dos diferentes recipientes, vidrio y plástico.

Producción de conidios en los sustratos sólidos

Se evaluaron dos sustratos: arroz entero y avena en grano tipo comercial y dos diferentes recipientes (vidrio y plástico). El arroz se lavó, posteriormente se precoció con la adición de 20 mL de aceite y 300 mL de agua en 500 g de arroz seco. El precocinar el arroz evita la formación de grumos durante la esterilización. Posteriormente se colocaron 50 g de arroz en cada recipiente, se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 40 minutos (adaptado de Arzumanov *et al.*, 2004). La avena se mantuvo en remojo durante 12 horas de acuerdo a la metodología reportada por Figueroa *et al.* (2007), para esto se pesaron 50 gramos de avena que se depositaron en matraces de 250 mL de capacidad conteniendo 100 mL de agua destilada, a las 12 horas el agua fue drenada por decantación y posteriormente se esterilizó en autoclave a 121 °C por 20 minutos por dos días consecutivos, los frascos fueron agitados para despegar los granos aglomerados. De cada sustrato y recipiente se prepararon 5 repeticiones. Posterior a la inoculación, los recipientes fueron incubados a temperatura de 25 ± 2 °C por 28 días, en periodos alternados de luz y oscuridad 14:10 de donde se tomaron muestras cada siete días, para determinar la producción de conidios.

Evaluación de la producción de conidios

Para esto se extrajo un gramo de cada sustrato y se colocó en un tubo falcon de 15 ml, el cual contenía 9 ml de agua destilada, se agitó en vortex durante un minuto, posteriormente se realizó el conteo de conidios colocando una alícuota de 20 μ l en la cámara de Neubauer y se observó con un objetivo de 40x.

Preparación de la suspensión de conidios para la mutagénesis.

En base a los resultados obtenidos de producción de conidios, nuevamente se preparó una suspensión de estos a concentración de 1×10^7 /ml a partir de una colonia monospórica del hongo con 6 semanas de incubación en PDAY, la cual fue sometida al proceso de mutagénesis.

Preparación de la solución stock de MSE

Esta fue preparada a una concentración inicial de 30,000 μ g/ml en agua destilada estéril. El procedimiento se realizó en una cámara de extracción de humos. Posteriormente se esterilizó por filtración en membrana Millipore de 0.2 micras y se prepararon diluciones en agua destilada estéril.

Mutación de *Hirsutella citriformis* con el agente químico metanosulfonato de etilo (MSE)

Para desarrollar cepas mutantes con MSE, se tomaron alícuotas de 1 mL de la suspensión de conidias (10^7 conidia/mL) las cuales fueron colocadas en tubos Eppendorf (2 mL). Los tubos fueron centrifugados a 8000 rpm por 15 min. El pellet fue lavado dos veces con buffer de fosfatos 0.1M (pH7) y resuspendido en el mismo buffer. Un volumen apropiado del MSE fue agregado para obtener diferentes concentraciones (50, 300, 500, 1000, 2000, 5 000 y 10 000 $\mu\text{g/ml}$). Se realizaron ensayos por triplicado en cada concentración. Las suspensiones fueron incubadas en agitación a $25 \pm ^\circ\text{C}$ durante 30 y 60 minutos para las primeras tres concentraciones y 60 y 180 minutos para las últimas cuatro concentraciones, para obtención de diferentes números de colonias mutantes. Después de la incubación se tomaron 100 μL y se agregaron a un tubo Eppendorf conteniendo 900 μL de una solución de tiosulfato de sodio al 6%, para la inactivación del MSE, se agitaron y se incubaron por 30 minutos más. Las esporas fueron cosechadas por centrifugación y lavadas dos veces con agua destilada estéril, finalmente se tomaron 50 μL de esta suspensión y fueron transferidos a cajas Petri con medio PDAY, donde se sembraron por estría y se incubaron a la temperatura ya mencionada.

La estabilidad de las colonias mutantes se evaluó mediante subcultivos sucesivos en Agar PDAY durante cuatro rondas de esporulación.

Producción de conidios de las cepas mutantes

Se evaluó la producción de conidios utilizando el medio de cultivo PDAY, en el cual se sembraron las cepas mutantes y silvestres, dejando incubar durante seis semanas a $25 \pm 2 ^\circ\text{C}$. Al finalizar el tiempo se agregaron 10 mL de agua estéril a cada caja y se contaron los conidios producidos tomando una alícuota de 20 μL de la suspensión para realizar el recuento en la cámara de Neubauer. Se colocaron 5 cajas por cada cepa mutante y se registró el promedio de 3 lecturas.

Velocidad de germinación de conidios

Se realizó una suspensión de conidios de cada una de las cepas mutantes así como de la cepa silvestre con seis semanas de crecimiento en medio PDAY. Posteriormente se ajustó la suspensión a una concentración de 1×10^6 conidios/ml, se tomaron alícuotas de 100 μL y se sembraron en cajas Petri con PDAY, con una cuadrícula dibujada en el fondo, se incubaron a $25 \pm 2 ^\circ\text{C}$ y cada 24 horas se cortaron fragmentos de 1 cm^2 del medio, se agregó una gota de azul de lactofenol. Se colocaron bajo el microscopio para observar la germinación, se contaron 100 conidios y se registró el número de conidios germinados. Se consideró conidio germinado aquel que presentara la longitud del tubo germinativo de al menos el tamaño del conidio.

Microcultivo

Se cortaron cuadros de 1 cm^2 del medio PDAY, posteriormente se colocaron tres cuadros por cada portaobjetos, el cual se ubicó dentro de la placa Petri y se sostuvo con ayuda de una varilla de vidrio delgada bajo condiciones asépticas; para obtener las condiciones de humedad se colocaron 5 mL de agua destilada estéril en la base de la caja Petri. Se inocularon las cuatro esquinas de cada cuadro de agar con una alícuota de la suspensión conidial de 1×10^6 conidios/mL, posteriormente se colocó un portaobjetos estéril sobre cada cuadro de agar inoculado. Las placas fueron mantenidas a temperatura de $25 \pm 2 ^\circ\text{C}$. A los 15 días se separó cuidadosamente el cubreobjetos del bloque de agar depositándolo sobre otro portaobjetos que contenía una gota del colorante azul de lactofenol por cada cuadro de agar, se selló cada cubreobjetos con esmalte de uñas transparente para realizar la observación y medición en el microscopio óptico con un objetivo de 40x.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio la cepa INIFAP-Hir 2 de *H. citrififormis* fue cultivada en dos sustratos, arroz y avena y analizada en la producción de conidios y posteriormente expuesta a diferentes concentraciones y tiempos del agente químico MSE. La cepa fúngica cultivada en el sustrato avena produjo significativamente mayor cantidad de conidios que en el sustrato arroz a los 28 días de incubación ($F=31.44$, $p<0.01$) y de los recipientes utilizados, hubo mayor producción de conidios (5.276×10^7 conidios/g) en el recipiente de plástico, probablemente por tener mayor área disponible de aireación (Figura 1). En relación a los sustratos utilizados, Rosas-Acevedo *et al.* (1995) encontró la mayor esporulación de cepas de *Hirsutella thompsonii* en sustratos como arroz, avena y sorgo, de ocho sustratos evaluados y reportó de 10^7 hasta 10^{10} conidios/g dependiendo del medio de cultivo y la cepa, esto concuerda con las investigaciones realizadas por Figueroa *et al.* (2007) donde la avena mostró tener uno de los mayores rendimientos en la esporulación del hongo entomopatógeno *I. fumosorosea* ya que guarda un alto contenido de humedad.

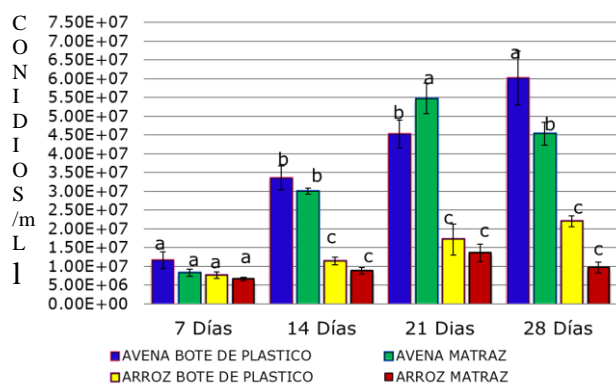


Figura 1. Producción de conidios de *H. citrififormis* en dos sustratos, utilizando dos recipientes.

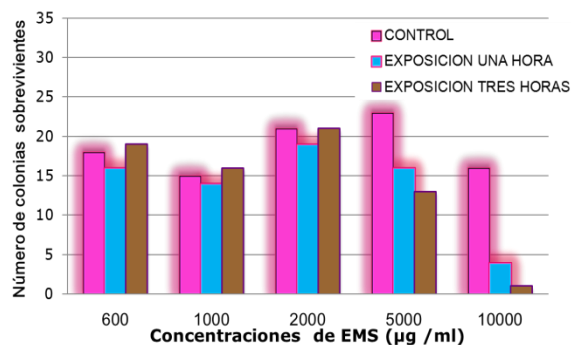


Figura 2. Número de colonias mutantes de *H. citrififormis* después de la exposición a MSE a dos tiempos.

Tabla 1. Número de colonias mutantes de *H. citrififormis* obtenidas después del tratamiento con Metanosulfonato de Etilo a altas concentraciones.

EMS (5 000 µg / ml)		EMS (10 000 µg / ml)	
Una hora	Tres horas	Una hora	Tres horas
16	13	4	1

Respecto a la mutagénesis, las colonias se aislaron en base a su supervivencia, obteniéndose un total de 104 colonias (Fig 2). De estas mutantes se examinaron las obtenidas a mayores concentraciones, para buscar las características deseadas (Tabla 1). En este experimento se observaron diferencias significativas en la cantidad de colonias mutantes sobrevivientes después de la exposición a las diferentes concentraciones y tiempos del MSE. Después de una exposición de 3 y una hora a 10 000 µg/mL de MSE, la cepa mostró 6% y 25% de supervivencia respectivamente. El tratamiento a 5 000 µg/ml de MSE por tres horas presentó 43% de supervivencia. Estudios previos han tenido éxito utilizando la misma concentración del mutágeno, como el trabajo de Molina *et al.*, (2001) quien utilizó una concentración de 10^7 esporas del hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum* y lo expuso a una concentración de 10 000 µg/ml por 25 minutos donde obtuvo 5% de esporas sobrevivientes. Las mutantes mostraron fenotipos diversos así como variaciones en las características morfológicas.

En cuanto a los resultados de velocidad de germinación, a las 24 horas se observó que la cepa mutante 53-10 mostró diferencia significativa respecto a las tres cepas restantes mutadas y diferencia parcial respecto al control (cepa silvestre) ($F=98.49, p<0.001$) mostradas en la Tabla 2. Se seleccionaron solo aquellas mutantes que mostraron diferencias significativas en su capacidad de esporulación (Figura 3) y mantuvieron un crecimiento radial mayor o igual que la cepa silvestre. La producción de conidios mostró diferencias significativas entre las cepas ($F= 172.86, p<0.001$). Las mutantes 103-9 y 53-10 mostraron significativamente mayor producción de conidios respecto al control (cepa silvestre), siendo la cepa 53-10, la que mostró el valor más alto (7.63×10^6 conidios/mL), comparado con el control que presentó una producción de 3.1×10^6 conidios/mL, a las 6 semanas de incubación en agar PDAY.

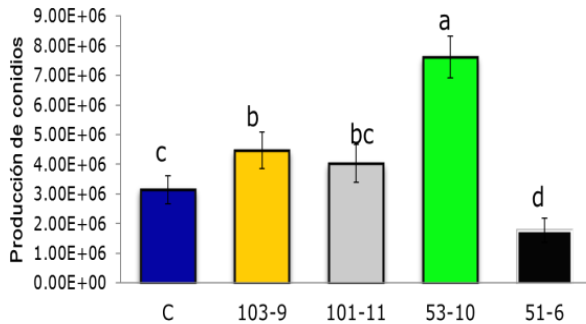
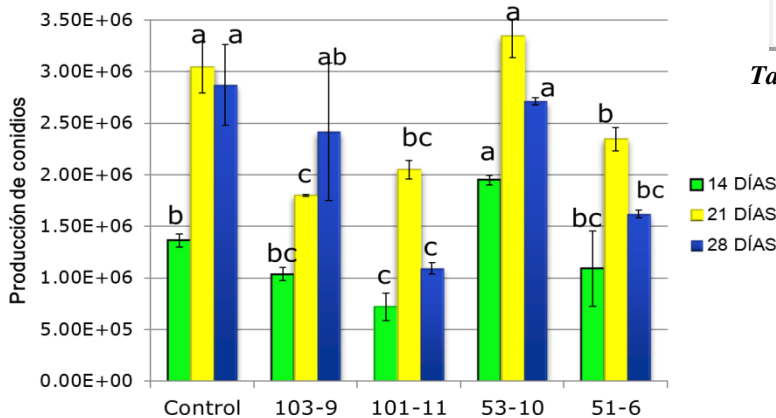


Figura 3. Producción de conidios de las cepas mutantes de *H. citriformis*, comparadas con la cepa silvestre (C) (control)

Se evaluaron las características morfológicas de la cepa silvestre y de las mutantes (Tabla 3). Donde se observa que las cepas mutantes 101-11, 53-10 y 51-6 mostraron conidios de tamaño significativamente mayor a la cepa silvestre ($F=27.52, p<0.001$). Dichas características son reconocidas como factores de virulencia (Safavi *et al.*, 2007).



Las cepas que produjeron mayor número de conidios sobre agar fueron posteriormente evaluadas en el sustrato avena durante 28 días (Figura 4). A los 21 días se observó la mayor producción de conidios en las cepas mutantes evaluadas así como el control, sin diferencias significativas en el número de conidios entre la cepa mutante 53-10, y la cepa silvestre. Sin embargo, visualmente la cepa mutante 53-10 muestra sinemas más largos.

Tabla 2. Porcentaje de germinación de cuatro cepas mutantes, comparadas con la silvestre (control)

	24 h	48h
Control	72 ab	94 a
103-9	70 b	88 a
101-11	31 c	74 b
53-10	80 a	91 a
51-6	36 c	58 b

Tabla 3. Comparación promedio del diámetro de conidios

	Control	103-9	101-11	53-10	51-6
4.07 b	3.94 b	6.45 a	6.99 A	6.69 a	

En relación al crecimiento radial, las cepas mutantes 103-15, 103-17, 101-19, 101-21, 101-22, 101-23, 53-3 y 51-11 mostraron más rápido crecimiento respecto al control, siendo esta última cepa la que mostró la mayor diferencia, con un crecimiento de 0.20 cm/día en comparación al control que presentó crecimiento de 0.16 cm / día.

También se observaron diferencias en la producción de sinemas en las cepas mutadas en general que no fueron evaluadas cuantitativamente.

CONCLUSIONES

Se obtuvo una mayor producción de conidios de la cepa silvestre de *H. citrifomis* sobre el sustrato avena, en comparación al arroz y también en el recipiente de plástico, que en vidrio, a los 28 días de incubación.

Se obtuvieron un total de 104 colonias mutantes de las cuales 2 de ellas mostraron un mejoramiento significativo en la producción de conidios en agar PDAY, sin embargo, cuando se cultivaron en el sustrato avena, la producción de conidios fue similar, para ambas cepas mutante y silvestre. Al parecer las cepas mutantes produjeron mayor número de conidios a los 21 días, acortando de esta manera el tiempo de máxima producción, de 28 a 21 días.

En relación a la germinación, una de las mutantes mostró porcentaje de germinación parcialmente mejorado a las 24 horas, sin embargo, para las 48 horas la germinación fue similar para ambas cepas, mutada y silvestre.

En el tamaño de conidios, tres de las cepas mutantes mostraron significativamente mayor tamaño que la cepa silvestre.

Se observaron además cambios en las características morfológicas de las cepas mutadas.

REFERENCIAS

Arzumanov T., Jenkins N., Roussos S. (2005). Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Process Biochem.*, 40: 1037–1042.

Bové J. M. (2006). Huanlongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88: 7-37.

Cabrera R. I., González C., Hernández D., Rodríguez J. L. (2004). Presencia del Hongo "*Hirsutella citrifomis*" sobre "*Diaphorina citri*" Kuw. (Homoptera: Psyllidae) en los cítricos de Cuba. *Levante Agrícola: Revista Internacional de Cítricos*, ISSN 0457-6039. No. 369, 2004, PP. 74-76.

Étienne J. S., Quilici D., Marival A. F. (2001). Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). *Fruits*, 56:307-315.

Figuroa L. M., Varela A., Corredor D. (2007). Evaluación de sustratos naturales para la propagación masiva del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumoroseous* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) *Revista de Investigación* año/ vol. 7, numero 001 Universidad La Salle Bogotá Colombia pp. 127 – 131.

González C. J. C., Castellanos S. I. E., Fucikovskiy Z. J., López H. M., Sánchez R. G., Elorza M. P., (2008). Dinámica de población y tasa de infección de *Diaphorina citri* al hongo *Hirsutella citrifomis* en *Citrus sinensis* en Tuxpan, Veracruz, México.

González-Hernández A., López A. I. J., Arredondo H. C., Argumedo J. J., Contreras M. L., y M.H. Cabrera-Mireles M. H. (2011). Determinación y distribución de hiperparasitoides asociados a *Diaphorina citri* kuwayama (Hemiptera: psyllidae), en México. 2° Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México, pp: 365, 369.

Hall D. G., Hentz M. G., Meyer J. M., Kriss A .B., Gottwald T. R., Boucias D. G. (2011). Observations on the entomopathogenic fungus *Hirsutella citriformis* attacking adult *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in a managed citrus grove. *BioControl*, 57: 663–675.

Meyer J. M., Hoy M. A., and Boucias D. G. (2007). Morphological and molecular characterization of a *Hirsutella* species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95: 101-109.

Molina S. M. G., Pelissari F. A., & Vitorello C. B. M. (2001). Screening and genetic improvement of pectinolytic fungi for degumming of textile fibers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 320–326.

Safavi S. A., Shah F. A., Pakdel A. K., Rasouljan G. R., Bandani A. R., and Butt T. M. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence off the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 270: 116-123.

Subandiyah S., Nikon N., Sato H., Wagiman F., Tsuyumu S., and Fakatsu T.(2000).Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera, Psilloidea) in Indonesia. *Mycoscience*, 41: 509-513.

Ribeiro O., Magalhães F., Aguiar T. Q., Wiebe M. G., Penttilä M., Domingues, L (2013). Random and direct mutagenesis to enhance protein secretion in *Ashbya gossypii*. *Bioengineered*, 4:5, 322–331.

Rivero-Aragon A. and Grillo-Ravelo H. (2000). Natural enemies of *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) in the central region of Cuba. *Centro-Agrícola*, 27: 87-88.

Rosas–Acevedo J. L., Alatorre R., Valdez J., y Sampedro L. (1994). Crecimiento micelial y esporulación de siete cepas de *Hirsutella thompsonii* y una de *H. nodulosa* en seis medios líquidos. *Agrociencia*, 5: 91–101.

Sánchez-Peña S. R., Casique-Valdés R., Bidochka M., Reyes-Martínez A. Y., López-Arroyo J. I. (2011). Caracterización Morfológica y Molecular, y Patogenicidad Hacia Psylloideos Vectores. 2° Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psilido Asiático de los cítricos y el Huanglonbing en México.

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria; <http://www.senasica.gob.mx>, recuperado el 20 de agosto de 2014.