

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



**“ESTRATEGIAS PARA EL BIOCONTROL DE *DIAPHORINA CITRI*
KUWAYAMA (HEMIPTERA: LIVIIDAE) CON *HIRSUTELLA CITRIFORMIS*
SPEARE”**

POR

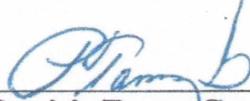
M. C. SERVANDO HORACIO CANTÚ BERNAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

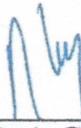
2024

“Estrategias para el biocontrol de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) con *Hirsutella citriformis* Speare”

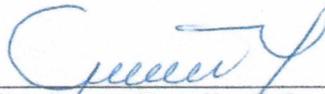
Comité de Tesis



Dra. Patricia Tamez Guerra
Director de Tesis



Dr. Ricardo A. Gómez Flores
Secretario



Dra. Guadalupe González Ochoa
Vocal 1



Dr. Alonso Alberto Orozco Flores
Vocal 2



Dra. María Julissa Ek Ramos
Vocal 3



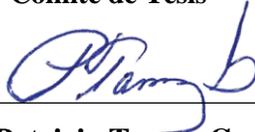
Dra. Katuska Arevalo Niño
Subdirectora de posgrado



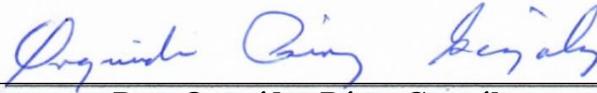
**DIRECCIÓN
DE POSGRADO**

**“Estrategias para el biocontrol de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera:
Liviidae) con *Hirsutella citrifomis* Speare”**

Comité de Tesis



Dra. Patricia Tamez Guerra
Director de Tesis



Dra. Orquídea Pérez González
Asesor externo

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el programa de apoyo FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACION PARA LA EDUCACIÓN GENERAL CIENCIA BÁSICA 2017-2018, CONACYT, Clave A1-S-1081042

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, Dra. Patricia Tamez Guerra y Dra. Orquídea Pérez González por su orientación experta, paciencia y apoyo constante a lo largo de este proceso. Su experiencia y sabios consejos fueron fundamentales para el éxito de este trabajo.

Quiero reconocer el apoyo y la colaboración de quienes formaron parte de mi comité Dra. Julissa Ek Ramos, Dra. Guadalupe González Ochoa, Dr. Alonso Alberto Orozco Flores, quienes brindaron atención, disponibilidad y valiosos consejos para el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos, compañeros y personal del laboratorio de Formulación de Biológicos y la Unidad de Inmunología y Acarreadores de Drogas que compartieron ideas, discusiones y experiencias durante el desarrollo de esta tesis. Su apoyo fue esencial para mantener un ambiente académico enriquecedor.

Agradezco a mis amigos y familiares por su comprensión, paciencia y aliento constante. Su apoyo emocional fue crucial para superar los desafíos y mantenerme enfocado en este proyecto.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología por la beca otorgada para el desarrollo de mis estudios de Maestría

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento. Este logro no habría sido posible sin su invaluable contribución.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	v
TABLA DE CONTENIDO	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
NOMENCLATURA	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Biología y epidemiología de <i>Candidatus Liberibacter</i> sp.	3
2.2 Enfermedad Huanglongbing de cítricos	4
2.3 Psílidos transmisores de <i>Candidatus Liberibacter</i> sp.	6
2.3.1 Descripción taxonómica <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama (Hemiptera: Liviidae).....	6
2.3.2 Biología y características morfológicas.....	6
2.3.3 Hospedantes y distribución geográfica de <i>D. citri</i>	7
2.4 Estrategias para el control de los vectores <i>D. citri</i>	8
2.4.1 Uso de hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de <i>D. citri</i>	9
3. JUSTIFICACIÓN.....	11
4. HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVO GENERAL	13

5.1 Objetivos específicos.....	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
6.1 Material biológico.....	14
6.1.1 Cepas de <i>Hirsutella</i> spp.....	14
6.1.2 Cría de insectos.....	14
6.2 Caracterización molecular de cepas aisladas de <i>Hirsutella</i>	14
6.3 Preparación del inóculo para la colonización endofítica de plantas.....	15
6.4 Evaluación de la colonización endofítica en plantas de cítricos mediante distintos métodos de inoculación	16
6.4.1 Inoculación por cuña (injerto).	16
6.4.2 Inmersión de semilla en metilcelulosa al 2%.	16
6.4.3 Asperjado foliar.	17
6.5 Evaluación de goma <i>Acacia</i> y goma de <i>Hirsutella</i> como adherentes bajo condiciones de laboratorio y campo.....	18
6.6 Evaluación de la efectividad de control biológico de los formulados a base de <i>H. citriformis</i> contra <i>D. citri</i> en laboratorio, invernadero y campo	19
6.6.1 Eficacia de formulados a base de <i>H. citriformis</i> contra adultos de <i>D. citri</i> en condiciones de laboratorio.	19
6.6.2 Eficacia de formulados a base de <i>H. citriformis</i> contra adultos de <i>D. citri</i> en condiciones de invernadero.	20
6.6.3 Eficacia de formulados a base de <i>H. citriformis</i> contra adultos de <i>D. citri</i> en condiciones de campo.	21
6.7 Análisis estadísticos	22
7. RESULTADOS.....	23
7.1 Caracterización molecular de aislamientos de <i>Hirsutella</i> spp.....	23
7.2 Evaluación de la colonización endofítica de <i>H. citriformis</i> en plantas de cítricos mediante distintos métodos de inoculación.....	25
7.3 Efectividad de formulados a nivel de laboratorio, invernadero y campo.	27

7.3.1 Evaluación de goma <i>Acacia</i> y goma de <i>Hirsutella citrifomis</i> como adherente a nivel de laboratorio.....	27
7.3.2 Evaluación de goma <i>Acacia</i> y goma de <i>Hirsutella citrifomis</i> como adherente a nivel de campo.	28
7.3.3 Efectividad de formulados de <i>Hirsutella citrifomis</i> contra <i>Diaphorina citri</i> a nivel de laboratorio.....	30
7.3.4 Evaluación de formulados de <i>Hirsutella citrifomis</i> contra <i>Diaphorina citri</i> a nivel de invernadero.	31
7.3.5 Evaluación de formulados de <i>Hirsutella citrifomis</i> contra <i>Diaphorina citri</i> a nivel de campo.	33
8. DISCUSIÓN.....	36
9. CONCLUSIONES	42
10 PERSPECTIVAS	43
11. PRODUCTOS ENTREGABLES.....	44
12. BIBLIOGRAFÍA.....	48
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas de HLB en limón mexicano.....	5
Figura 2. Adulto de <i>Diaphorina citri</i> , huevos y estadíos ninfales.	7
Figura 3. Árbol filogenético de las secuencias del gen de β - tubulina de asilados de <i>H. citrifomis</i> junto a secuencias de referencia.	23
Figura 4. Árbol filogenético de las secuencias del gen 28S ARNr de asilados de <i>H. citrifomis</i> junto a secuencias de referencia.	24
Figura 5. Árbol filogenético de las secuencias de la región ITS de asilamientos de <i>H. citrifomis</i> junto a secuencias de referencia.	25
Figura 6. Promedio de la mortalidad de adultos de <i>Diaphorina citri</i> al evaluar gomas como adherentes en condiciones de laboratorio.....	28
Figura 7. Promedio de la mortalidad de los adultos de <i>Diaphorina citri</i> al evaluar las gomas como adherentes en condiciones de campo en Octubre 2020..	29
Figura 8. Promedio de la mortalidad de los adultos de <i>Diaphorina citri</i> al evaluar las gomas como adherentes en condiciones de campo en Octubre 2021..	30
Figura 9. Porcentajes de mortalidad de adultos de <i>Diaphorina citri</i> después de la aplicación por aspersión de conidios formulados de <i>H. citrifomis</i> en condiciones de laboratorio...	31
Figura 10. Porcentajes de mortalidad y promedios de desarrollo del micelio aéreo (esporulación) causados por conidios formulados de <i>H. citrifomis</i> , aplicado por aspersión sobre <i>Diaphorina citri</i> adultos en condiciones de invernadero.....	32
Figura 11. Porcentajes de mortalidad de adultos de <i>Diaphorina citri</i> después de la aplicación por aspersión de conidios formulados de <i>H. citrifomis</i> en condiciones de campo.	33
Figura 12. Porcentajes de mortalidad y promedios de desarrollo del micelio aéreo (esporulación) causados por conidios formulados de <i>H. citrifomis</i> , aplicado por aspersión sobre adultos de <i>Diaphorina citri</i> en condiciones de campo en Octubre 2022..	34

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de colonización de hongos entomopatógenos en diferentes segmentos de la planta <i>Citrus sinensis</i> mediante el método de cuña.	26
Tabla 2 Frecuencia de colonización de hongos entomopatógenos en hoja de la planta <i>Citrus sinensis</i> mediante la inoculación de semillas recubiertas con metil-celulosa al 2%.	26
Tabla 3. Frecuencia de colonización de hongos entomopatógenos en diferentes segmentos de la planta <i>Citrus sinensis</i> mediante el método de aspersion foliar.	27
Tabla 4. Tiempo letal medio (TL ₅₀) de los adultos de <i>D. citri</i> expuestos a conidios y gomas como adherentes.	28
Tabla 5. Tiempo letal medio (TL ₅₀) de los adultos de <i>D. citri</i> expuestos a las distintas formulaciones en condiciones de laboratorio.	31

NOMENCLATURA

° C	Grados Celsius
µL	Microlitro
ARNr 18s	Subunidad ribosomal 18s
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Log10	Logaritmo base 10
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
pb	Pares de bases
PBS	Solución buffer fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrogeno
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
sp.	especie
HLB	Enfermedad de Huanglongbing
HE	Hongos entomopatógenos
MIP	Manejo integrado de plagas
PAC	Psílido asiático de los cítricos
TL ₅₀	Tiempo letal medio

RESUMEN

Hirsutella citriformis Speare es el único hongo entomopatógeno que se ha reportado que causa epizootias en adultos de *Diaphorina citri* en varias regiones del mundo. Sin embargo, es limitado el uso de productos comerciales de este hongo, disponibles en condiciones de campo, debido a la vida útil de los conidios y su corta persistencia ambiental. El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar un método de control biológico contra *Diaphorina citri* mediante el uso de *Hirsutella citriformis* como endófito y en formulación. El presente trabajo consistió en identificar molecularmente cepas de *H. citriformis* aisladas en las principales regiones citrícolas de México, determinar la capacidad de colonización de *H. citriformis* en plantas de *Citrus × sinensis* L mediante los métodos de inoculación por cuña, semilla, y asperjado foliar. Además, se evaluaron diferentes formulaciones a base de conidios y gomas de *H. citriformis*, para mejorar el biocontrol de *D. citri* en adultos, en condiciones de laboratorio, invernadero y campo, utilizando gomas de *Hirsutella* como estabilizadores de conidios y adherente, para mejorar su viabilidad en condiciones de sequía ambiental. Los resultados demostraron que *H. citriformis* no tuvo la capacidad de colonizar como endófito a *Citrus × sinensis* L mediante los métodos empleados. Los experimentos de laboratorio y campo realizados para evaluar adherentes, mostraron que la goma de *H. citriformis* es compatible con los conidios de *H. citriformis* y posee un efecto tóxico en los adultos de *D. citri*. La evaluación de diferentes formulaciones demostró su efectividad para el control de poblaciones de adultos de *D. citri* a nivel de laboratorio, invernadero y campo. En conclusión, que el uso de aceite vegetal en polvo y goma de *Hirsutella* no afectan los conidios de *H. citriformis* e incrementan la efectividad de control de psílicos.

ABSTRACT

Hirsutella citriformis Speare is the only entomopathogenic fungus that has been reported to cause epizootics naturally in adults of *Diaphorina citri* in several regions of the world. However, the use of commercially available products under field conditions is limited due to the conidia's shelf life and their short environmental persistence. The main objective of this work was to develop a biological control method against *D. citri* through the use of *H. citriformis* as an endophyte and in formulation. The present study consisted of molecular identification of *H. citriformis* strains isolated from the main citrus regions of Mexico and determining the colonization capacity of *H. citriformis* in *Citrus × sinensis* L plants using the inoculation by wedge, seed, and foliar spraying methods. In addition, different formulations based on conidia and gums of *H. citriformis* were evaluated to improve the *D. citri* adults biocontrol under laboratory, greenhouse, and field conditions. *Hirsutella* gums were added as conidia stabilizers to improve its viability in conditions of environmental drought. Results demonstrated that *H. citriformis* did not have the ability to colonize *Citrus × sinensis* L, using the methods tested. Laboratory and field experiments performed to evaluate conidia adherents, showed that *H. citriformis* gum was compatible with the *H. citriformis* conidia and was toxic against *D. citri* adults. The effectiveness of different formulations showed that they controlled the adult populations of *D. citri* at the laboratory, greenhouse, and field levels. In conclusion, the use of powdered vegetable oil and *Hirsutella* gum do not affect the *H. citriformis* conidia and increase the psyllid control effectiveness.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad Huanglongbing (HLB), también conocida como enverdecimiento (greening) de los cítricos o enfermedad del dragón amarillo, es causada por cuatro especies de α -proteobacterias: *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter americanus* y *Ca. Liberibacter caribbeanus* son transmitidas a la planta por el insecto vector *Diaphorina citri* Kuwayama, mientras que *Ca. Liberibacter africanus* es transmitida por *Trioza erytrae*. El HLB es reconocida actualmente como la enfermedad más devastadora de los cítricos a nivel mundial. En México, el HLB se encuentra en 351 municipios pertenecientes a 25 estados citrícolas del país (SENASICA 2022) aunque los mayores daños se han registrado en los huertos comerciales de Colima, Nayarit, Jalisco, Michoacán y Sinaloa (Ruiz-Galván et al. 2015).

Las estrategias para el manejo de *D. citri* se basan en diferentes métodos que incluyen al control químico, biológico y cultural, los cuales son necesarios para lograr un manejo sustentable de la plaga y de esta manera reducir la incidencia de la enfermedad (Gandarilla-Pacheco et al. 2013). Sin embargo, las aplicaciones masivas de insecticidas químicos traen consigo una mayor presión de selección y por lo tanto mayor riesgo de desarrollo de resistencia, así como daños al medio ambiente y la salud (SENASICA 2022).

Entre los agentes de control biológico de *D. citri* se encuentran una gran variedad de artrópodos depredadores y parasitoides; además de diferentes especies de hongos entomopatógenos como *Hirsutella citriformis* Speare, *Isaria fumosorosea* Wize, *Metarhizium anisopliae* Metschnikoff y *Beauveria bassiana* Bals.-Vuill. (Lezama-Gutierrez et al. 2014, Berlanga-Padilla et al. 2018).

Estudios realizados en México por Pérez et al. (2016a) evaluaron la infectividad de conidios de 4 cepas mexicanas de *H. citriformis* Speare en contra de adultos de *D. citri* en condiciones de semicampo, donde todas las cepas mostraron patogenicidad con un rango promedio de 51.05-50.6% y observaron después de 30 días de realizado el bioensayo en la huerta, un incremento de 2.33 a 10.2 (337.7%) de insectos micosados por *H. citriformis*. Además, Pérez et al. (2016b) demostraron

que la aplicación de *H. citriformis* al parecer no afecta a insectos no blanco, como son *Hippodamia convergens* Guérin-Ménéville (Coleoptera: Coccinellidae) y *Chrysoperla rufilabris* Burmeister (Neuroptera: Chrysopidae), demostrando así el uso seguro de este agente de control biológico como una alternativa potencial en un programa de manejo integrado del HLB.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método de control biológico contra *Diaphorina citri* mediante el uso de *Hirsutella citriformis* como endófito y en formulación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Biología y epidemiología de *Candidatus Liberibacter* sp.

Las especies de *Candidatus Liberibacter* son bacterias Gram negativas que viven como parásitos obligados de plantas y psílidos, debido a esto solo pueden multiplicarse dentro de sus huéspedes eucariotas (Merfa et al. 2019). Estas bacterias son transmitidas por insectos pulgones y psílidos que se alimentan de la savia del floema vegetal, fungiendo, así como vectores (Sakar y Ghanim et al. 2020). El rango de especies de plantas infectadas por una determinada especie de *Ca. Liberibacter* se encuentra restringido por el rango de hospedadores del insecto vector que generalmente se limita a unas pocas especies de plantas estrechamente relacionadas, entre las cuales se encuentran los cultivos pertenecientes a las familias Rutaceae, Solanaceae y Apiaceae (Quintana-González et al. 2020). El género *Candidatus Liberibacter* se distribuye de manera heterogénea en el floema de la corteza, en la nervadura central de hojas, en raíces, en diferentes partes florales y en frutos, sin embargo, esta bacteria no se ha encontrado en endospermo y embriones de semillas procedentes de frutos infectados (Robles-González et al. 2013). Al presente, no ha sido posible cultivar esta bacteria *in vitro* lo que restringe el uso de métodos microbiológicos para su caracterización bacteriana, sin embargo, los métodos basados en detección de ADN son muy sensibles y nos permiten detectar y monitorear la presencia de este patógeno (Haapalainen 2014; Camacho-Tapia et al. 2016)

En la actualidad, han surgido brotes involucrando a diferentes especies de *Ca. Liberibacter* en distintos continentes, entre las especies de *Ca. Liberibacter* se encuentran *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter africanus*, *Ca. Liberibacter americanus* que causan el Huanglongbing (HLB) también conocida como enfermedad de enverdecimiento de cítricos; mientras que *Ca. Liberibacter solanacearum* causa la enfermedad Zebra Chip en cultivos de papa, la enfermedad permanente del tomate y la enfermedad de brotes cloróticos en cultivos chile (Haapalainen 2014; Delgado-Ortiz et al. 2019).

2.2 Enfermedad Huanglongbing de cítricos

El Huanglongbing (HLB), también conocida como enverdecimiento (“greening”) de los cítricos o enfermedad del dragón amarillo, es una enfermedad asociada con la infección de varias especies de α -proteobacterias: *Ca. Liberibacter asiaticus* y *Ca. Liberibacter americanus* transmitidas a la planta por el Psílido Asiático de los Cítricos (PAC) *Diaphorina citri* Kuwayama mientras que *Ca. Liberibacter africanus* es transmitida por *Trioza erytrae* (Aidoo et al. 2020). El HLB está actualmente considerada como la enfermedad más devastadora de los cítricos a nivel mundial y en la actualidad no existe cura para árboles que padecen esta enfermedad (Mora-Aguilera et al. 2014).

Las plantas una vez infectadas, presentan síntomas solo después de un período de latencia de aproximadamente 6 a 12 meses, la planta afectada presenta amarillamiento de uno o más brotes, que con el tiempo se extiende a toda la planta pudiendo ocasionar su muerte dependiendo del estado nutricional de la planta (Gottwald 2010). Los síntomas del HLB incluyen manchas moteadas y clorosis, que pueden llegar a confundirse con deficiencias nutrimentales, además de achaparramiento y reducción del follaje conforme progresa la enfermedad (Figura 1) (da Graca 2008). El rendimiento de los árboles afectados es menor, y éstos pueden producir frutos pequeños y de mala calidad siendo las variedades comerciales las más susceptibles (Camacho-Tapia et al. 2016).

Las pérdidas reportadas a nivel mundial se han reportado desde el 26% en Brasil hasta un 100% en China, mientras que en México en naranja dulce se reportan pérdidas de 42 %, en limón mexicano 62% y en limón persa 17.3% (Mora-Aguilera et al. 2014).



Figura 1. Síntomas de HLB en limón mexicano. A) síntomas en ramas de un sector afectado; B) Árbol con sintomatología; C) Evolución de los síntomas en las hojas. Fuente Robles-González et al. (2013)

En México, las especies de cítricos de mayor importancia son la naranja dulce (63.6%), limón en todas sus especies (26.5%), mandarina (5.5%) y toronja (5.5%) (Hernández-Hernández et al. 2019). Sin embargo, estimaciones recientes sobre el impacto potencial de la enfermedad en los cítricos de México, anticipan que el HLB puede causar una reducción en el rendimiento del limón mexicano que va de 20 a 48% en los primero tres años, dependiendo del nivel de intensidad del daño, en un escenario de alta presencia en México, sería la pérdida de 1.7 millones de toneladas y 112.2 millones de jornales, siendo más vulnerable el cultivo de naranja (Díaz-Padilla et al. 2014).

Actualmente, el HLB se encuentra en 351 municipios pertenecientes 25 estados citrícolas del país (SENASICA 2022), afectando principalmente a los huertos comerciales de cítricos de los estados de Sinaloa, Colima, Jalisco, Michoacán y Nayarit (Ruiz- Galván et al. 2015).

2.3 Psílicos transmisores de *Candidatus Liberibacter* sp.

2.3.1 Descripción taxonómica *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Suborden: Sternorrhyncha

Superfamilia: Psylloidea

Familia: Liviidae

Género: *Diaphorina*

Especie: *citri*

2.3.2 Biología y características morfológicas.

El psílido asiático de los cítricos mide de 2.7 a 3.3 mm de longitud, tiene un color marrón claro, con moteados recubiertos de polvo ceroso, alas transparentes con manchas marrón claro en el borde (Tsai y Liu 2000). Los adultos pueden encontrarse descansando o alimentándose de las hojas con la cabeza en la superficie de la hoja y su cuerpo sostenido en un ángulo de 45° sobre la superficie de la hoja (Figura 2). Este psílido se alimenta insertando sus piezas bucales en el tejido vegetal, los adultos se alimentan preferentemente de tallos jóvenes y de hojas de todas las etapas de desarrollo, su rango de temperatura óptima de desarrollo es de 24°C a 28 °C, su ciclo de vida a 25°C es de 20 a 22 días (Hall et al. 2013).

El tamaño promedio de un huevo es de 0.31 mm de largo y 0.14 mm de ancho, con forma ovalada, presentan un color amarillo claro y color naranja brillante con dos puntos rojos distintos en la madurez mientras que las ninfas, son aplanadas, de color amarillento, sin alas, pero con paquetes alares, ojos de color rojo y antenas filiformes (Hall 2008). Son de movimientos lentos y se alimentan de las partes tiernas de las plantas donde se desarrollan. Pasan por cinco estadios ninfales y secretan filamentos cerosos, que los protegen de posibles depredadores (Hall 2008).



Figura 2. Adulto de *D. citri* alimentándose (izquierda), huevos y estadios ninfales (derecha). Fuente: SENASICA 2019.

2.3.3 Hospedantes y distribución geográfica de *D. citri*

Los principales hospedantes de *D. citri* son especies de la familia Rutaceae, como las naranjas (*Citrus sinensis*), toronja (*C. paradisi*), lima (*C. aurantifolia*), naranja agria (*C. arantium*), limón (*C. aurantifolia*), limón persa (*C. latifolia*), mandarina (*C. reticulata*), pomelo (*C. grandis*). La limonaria (*Murraya paniculata*), usada como planta de ornato, es un hospedante preferencial, mientras que *M. koenigii* es un hospedante del psílido en India y Sri Lanka (SENASICA 2019)

El psílido asiático de los cítricos, *D. citri*, fue descrito por primera vez en Taiwán por Kuwayama en 1908 (Carlson et al. 2022). En México, fue detectado por primera vez en 2002, en los estados de Campeche y Quintana Roo, y desde entonces se ha dispersado a todas las áreas productoras de cítricos del país (SENASICA 2019).

2.4 Estrategias para el control de los vectores *D. citri*.

Se han implementado diversos métodos y estrategias de control para enfrentar tanto a los vectores como las enfermedades, donde el manejo de las enfermedades está basado en el control de los insectos vectores, así como la eliminación de fuentes de inóculo por medio de la erradicación de los árboles enfermos y el establecimiento de anillos fitosanitarios alrededor de dichas plantas (Hernández-Fuentes et al. 2012).

Las estrategias para el manejo de *D. citri* se han basado en diferentes métodos que incluyen al control químico, biológico y cultural, los cuales son necesarios para lograr un manejo sustentable de la plaga y de esta manera reducir la incidencia de la enfermedad (Gandarilla-Pacheco et al. 2013). En México, el control químico es el más utilizado entre los productores, usando productos de contacto y sistémicos, con acción inmediata y residualidad hasta de 30 días, siendo recomendado iniciar las aplicaciones previo a los máximos picos poblacionales del vector, esto a principio de año cuando las condiciones son favorables para el aumento de la población (SENASICA 2019). Entre los insecticidas más usados en el mundo para el control del vector se encuentran temik, imidacloprid, dimetoato, clorpirifos, malation, cipermetrina, deltametrina, betaciflutrina, spinotetramat, spinetram, oxamyl, ácidos tricarbóxicos, ometoato, sulfoxafor, aceites minerales (Ruiz- Galván et al. 2015). Sin embargo, las aplicaciones masivas traen consigo una mayor presión de selección y por lo tanto mayor riesgo de desarrollo de resistencia, así como daños al medio ambiente y la salud, la estrategia más aceptada para el manejo de la resistencia con el uso de pesticidas es la aplicación en rotación de insecticidas efectivos con diferentes modos de acción y destoxificación (SENASICA 2019).

El control biológico es un factor importante en la reducción de la población de plagas en los programas de manejo integrado de plagas (MIP), dentro del control biológico se ha detectado la presencia de insectos entomófagos y parasitoides de *D. citri*, además de diferentes especies de hongos entomopatógenos, entre los que se incluyen: *Hirsutella citriformis* (Rivero y Grillo 2000; Subandiyah et al. 2000; Etienne et al. 2001; Meyer et al. 2007; Hall et al. 2012), *Isaria fumosorosea* (Samson

1974; Subandiyah et al. 2000; Meyer et al. 2007), *Lecanicillium lecanii* Zimm. (Rivero y Grillo 2000; Xie et al. 1988), *Beauveria bassiana* (Rivero y Grillo 2000) y *Metarhizium anisopliae* (Lezama-Gutiérrez et al. 2014, Berlanga-Padilla et al. 2018). En México, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) a través de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV), desarrolla un programa de control biológico para el manejo de *D. citri* a través del uso de hongos entomopatógenos (HE) y de parasitoide *Tamarixia radiata* (Waterston) (Berlanga-Padilla et al. 2018).

2.4.1 Uso de hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de *D. citri*

En la actualidad, muchas especies de hongos entomopatógenos se formulan como bionsecticidas, entre los principales hongos usados en formulación son *Cordyceps confragosa* (Anteriormente *Lecanillicum lecanii*), *Beauveria bassiana*, *Metarhizium* spp. y *Cordyceps fumosorosea* (anteriormente *Isaria fumosorosea*) (Sharma et al. 2023). Estos bioinsecticidas proporcionan opciones viables para su inclusión en el MIP, ya que presentan mayor inocuidad que los insecticidas convencionales y tienen el potencial de poder diseminarse y circular entre la población plaga (Mauchline y Stannard 2013). *H. citriformis* es el único hongo que se ha encontrado causando epizootias de manera natural en *D. citri* en diversas regiones del mundo (Cabrera et al. 2004; Meyer et al. 2007; Hall et al. 2012). En México se tienen reportes de epizootias de *H. citriformis* en los estados de Tamaulipas y Veracruz (Casique et al. 2011).

Subandiyah et al. (2000) aislaron a *Cordyceps fumosorosea* e *Hirsutella citriformis* de cadáveres micosados de *D. citri*, Meyer et al. (2007) evalúan la capacidad infectiva de los conidios de *H. citriformis* observando que al exponer adultos sanos de *D. citri* poniéndolos en contacto con los conidios de insectos infectados; los insectos se infectaban y morían. Por otra parte, en México, Pérez et al. (2016a) evaluaron la infectividad de conidios de 4 cepas mexicanas de *H. citriformis* Speare en contra de adultos de *D. citri* en condiciones de semi-campo, los resultados obtenidos mostraron que todas las cepas presentaron patogenicidad, siendo los mayores porcentajes de

mortalidad en un rango promedio de 51.05-50.6% y observaron después de 30 días de aplicado el bioensayo en la huerta un incremento de 2.3 a 10.2 insectos micosados por *H. citrifomis*, además Pérez et al. (2016b) demostraron que la aplicación de *H. citrifomis* no afecta a insectos no blanco, como son *Hippodamia convergens* Guérin-Ménéville (Coleoptera: Coccinellidae) y *Chrysoperla rufilabris* Burmeister (Neuroptera: Chrysopidae) lo que demostró que el uso de este agente de control biológico era seguro y se podía implementar como alternativa en un programa de manejo integrado del HLB.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, han surgido brotes de HLB en diferentes continentes involucrando a especies de *Ca. Liberibacter* como agente causal, y como vectores a los psílidos. Entre las especies de *Ca. Liberibacter* asociadas se encuentran *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter africanus*, *Ca. Liberibacter americanus*, afectando a cultivos de cítricos causando la enfermedad de enverdecimiento de cítricos o Huanglongbing.

El HLB está reconocida actualmente como la enfermedad más devastadora de los cítricos a nivel mundial y en la actualidad no existe cura para árboles que padecen esta enfermedad. A nivel mundial, se reporta un impacto epidémico alto del HLB, con niveles de incidencia desde 26 % (Brasil) hasta 100 % (China), mientras que en México se reportan pérdidas de 42 % en naranja dulce, en limón mexicano 62% y en limón persa 17.3%. Actualmente el HLB se encuentra presente en 25 estados citrícolas del país, aunque los mayores daños se han registrado en huertas comerciales de Colima, Nayarit, Jalisco, Michoacán y Sinaloa.

Por ello, en el presente trabajo se determinó la capacidad de establecimiento endofítico de *H. citrifomis* en plantas de cítricos, así como la evaluación de un formulado a nivel de laboratorio, invernadero y campo contra las poblaciones de *D. citri*, para contribuir con el desarrollo de estrategias de control de estas enfermedades, para ofrecer una nueva herramienta para los productores citrícolas del país.

4. HIPÓTESIS

Hirsutella citriformis como endófito o en formulación, actúa como agente de control biológico contra *Diaphorina citri*.

5. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método de control biológico contra *Diaphorina citri* mediante el uso de *Hirsutella citriformis* como endófito y en formulación.

5.1 Objetivos específicos

- Caracterizar molecular y morfológicamente cepas de *H. citriformis* aisladas de los principales estados productores de cítricos de México.
- Evaluar la capacidad de *H. citriformis* para establecerse como endófito en plantas de cítricos.
- Determinar la efectividad de control biológico de formulados a base de *H. citriformis* contra *D. citri* en laboratorio, invernadero y campo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

6.1.1 Cepas de *Hirsutella* spp.

Las 11 cepas de *Hirsutella* OP-Hir-10, OP-Hir-11, OP-Hir-8, OP-Hir-9, OP-Hir-12, OP-Hir-3, OP-Hir-7, OP-Hir-5 y OP-Hir-6 fueron previamente aisladas por investigadores de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL a partir de insectos adultos micosados de *D. citri* provenientes de los estados de Yucatán, Quintana Roo, Colima, Tabasco, y Veracruz. Las cepas fúngicas se mantuvieron mediante resiembra periódica en Agar dextrosa y papa adicionado con extracto de levadura al 1% y conservadas en crioviales de muestras con glicerol al 30%, los cuales se mantuvieron a -70 °C.

6.1.2 Cría de insectos

Se inició una cría de *Diaphorina citri* realizando colectas de insectos adultos en huertas de cítricos del Estado de Nuevo León. Los insectos fueron colectados de campo de brotes de árboles de cítricos usando un aspirador bucal adaptado a un depósito de plástico y transportados al invernadero en hieleras. La colonia se estableció en jaulas de 80 cm x 80 cm x 150 cm de largo, ancho y alto recubierto con tela organza. Se empleó a plantas de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* L.) y naranjo valencia (*Citrus sinensis* L.), como hospederos mantenidos en condiciones semi invernadero, se introdujeron 50 adultos por cada árbol de cítrico presente.

6.2 Caracterización molecular de cepas aisladas de *Hirsutella*

Para la caracterización molecular se utilizó la metodología propuesta por Pérez-González et al. (2015a), las cepas de *Hirsutella* spp. se cultivadas en caldo

dextrosa papa, durante 15 días a 250 rpm y 25 °C. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados a 14000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante. El micelio se transfirió a tubos cónicos de 1.5 mL de capacidad, se lavaron en dos ocasiones con el buffer Tris (TE 1 X). Se añadieron 250 µL de buffer de lisis (200 mM Tris pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) y se maceraron con la ayuda de un pistilo. Se agregaron nuevamente 250 µL de buffer de lisis y 500 µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min y se recuperó el sobrenadante. Por último, el ADN se precipitó añadiendo acetato de sodio (3M, pH 7) e isopropanol, seguido de un lavado con etanol al 70%, y se resuspendió en buffer TE 1X.

El ADN purificado fue amplificado utilizando los oligonucleótidos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGAATATGC-3'), bajo las condiciones de 95 °C por 5 min de desnaturalización inicial, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, un alineamiento a 60 °C por 45 s y un proceso de extensión a 72°C por 90 s, finalizando por un paso de extensión final de 72 °C por 8 min. Así mismo, se amplificó el gen parcial 28S ribosomal, utilizando los oligonucleótidos LS1 (5'-AGTACCCGCTGAACTTAAG-3') y LR5 (5'-CCTGAGGGAACTTCG-3'), bajo las condiciones descritas por Meyer et al. (2007).

Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR *clean-up system* (Promega, Invitrogen), y posteriormente se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM para su secuenciación.

6.3 Preparación del inóculo para la colonización endofítica de plantas

Se cultivó una cepa de *Hirsutella citrifomis* (OP-Hir-10) en agar dextrosa papa, adicionado al 1% con extracto de levadura; el cultivo se incubó por 6-7 semanas hasta alcanzar una conidiación abundante. Una vez observado esto, se tomó la caja de Petri y se le adicionaron 10 mL de agua estéril, y, con la ayuda de un asa micológica, se realizó un raspado superficial para desprender los conidios. Posteriormente, se transfirió la suspensión de conidios a un tubo cónico de 50 mL y se determinó su

concentración por observación directa en una cámara de Neubauer. Finalmente se ajustó a la concentración deseada (Pérez et al. 2015b).

Además, se determinó el porcentaje de germinación de esporas. Para lograrlo, se cortaron cuadros de aproximadamente 1 cm² en una caja de Petri con PDA, donde se colocaron 10 µL de las suspensiones de esporas. Las cajas Petri se incubaron a 25 ± 2 °C durante 72 a 96 h, posteriormente se contabilizaron 100 conidios bajo el microscopio, donde fueron positivos si el tubo germinativo era igual o mayor al tamaño que del conidio (Pérez-González et al. 2017).

6.4 Evaluación de la colonización endofítica en plantas de cítricos mediante distintos métodos de inoculación

6.4.1 Inoculación por cuña (injerto).

Se realizó un corte tipo cuñas de 1cm² en el tallo de cada una de las 8 plantas de *Citrus × sinensis* para cada tratamiento, donde se colocó un trozo de agar con *H. citrifomis* (OP-Hir-10) o *B. bassiana* de aproximadamente 1-cm², con una concentración de 1×10⁷ conidios/mL, los cortes se sellaron con papel parafilm. El control positivo fue *B. bassiana* y como control negativo se utilizó PDA adicionado con extracto de levadura al 1% (Polanco-Florian et al. 2019). La presencia endofítica de los hongos en las plantas se determinó a las 4 y 8 semanas post-inoculación. Para lograrlo, se tomaron hojas superiores (hojas nuevas), hojas inferiores y tallo de las plantas tratadas; se realizó una desinfección del material vegetal con etanol al 70% durante 3 min e hipoclorito de sodio al 2% durante 3 min, y, por último, se enjuagaron en tres ocasiones con agua estéril y se sembró por extensión 100 µL de agua destilada del último lavado en PDAY (Bamisile et al. 2019). De las distintas partes de la planta, se sembraron 5 trozos por caja con PDAY y se incubaron a 25 ± 2°C, se observaron cada 3 días en busca de crecimiento de *H. citrifomis* o *B. bassiana* durante 21 días.

6.4.2 Inmersión de semilla en metilcelulosa al 2%.

Se utilizaron 30 semillas de *Citrus × sinensis*, estas fueron sumergidos en 10 mL de una suspensión de *H. citrifomis* (OP-Hir-10) y otras en *B. bassiana* a una concentración de 1×10⁷ conidios/mL con metil-celulosa al 2% por alrededor de 24

horas. Una vez transcurrido el tiempo, las semillas se dejaron secar en papel durante 30 min y posteriormente se sembraron en macetas de 15 cm. Como control positivo se *B. bassiana* y como control negativo se utilizó agua destilada estéril (Kuzhuppillymyal-Prabhakarankutty et al. 2020). El establecimiento endofítico de los hongos se determinó a las cuatro y ocho semanas post-germinación de las semillas tratadas, para evaluar la colonización de los hongos, se tomó una hoja de cada planta y se esterilizaron con etanol al 70% durante 3 min e hipoclorito de sodio al 2% durante 3 min, se enjuagaron en tres ocasiones con agua estéril (Bamisile et al. 2019). Para verificar la esterilización, se sembraron 100 μ L del último lavado en PDAY por extensión. Las hojas fueron seccionadas en partes utilizando un bisturí estéril y cuatro secciones de cada hoja fueron sembrados en agar PDAY adicionado con ácido láctico para evitar contaminación bacteriana. Los cultivos se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y se revisaron cada tres días para detectar el crecimiento de hongos. Las partes de tejidos de la planta que presentaron crecimiento de hongos fueron transferidos a otra placa de agar papa dextrosa suplementado con extracto de levadura al 1% (PDAY), esto para prevenir contaminación.

6.4.3 Asperjado foliar.

Para esta técnica, se utilizaron las mismas cepas que en las técnicas anteriores. Se utilizaron 12 plantas por tratamiento con 14 semanas de crecimiento las cuales se asperjaron (utilizando un aspersor manual) con 10 mL del inóculo, a una concentración de 1×10^8 conidios/mL de cada hongo o agua destilada estéril con solución Tween 80 al 0.01% como control absoluto. Por último, las plantas fueron recubiertas con una bolsa de nylon por 24 horas y se mantuvieron en un invernadero a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa de 65-75% con fotoperiodo de 14:10 horas luz: oscuridad para evaluar la colonización endofítica (Bamisile et al. 2019). La evaluación de la colonización endofítica se determinó a las 4, 8 y 12 semanas post-inoculación tomando hojas superiores (hojas nuevas) y hojas inferiores. Estas hojas superiores e inferiores fueron desinfectadas utilizando la metodología previamente descrita, se cortaron en secciones y se inocularon 4 secciones de cada hoja en PDAY. Los resultados se expresaron como:

La frecuencia de colonización: (Número de secciones en tejido (hoja, tallo, raíz) colonizado/ total de secciones del tejido) \times 100 (Allegrucci et al. 2017).

6.5 Evaluación de goma *Acacia* y goma de *Hirsutella* como adherentes bajo condiciones de laboratorio y campo.

Para evaluar tanto en laboratorio como en campo 5 tratamientos, dos de ellos como testigos en los cuales solo se usaron suspensiones acuosas con las gomas; el tratamiento TGH con goma de *H. citrifomis* al 0.5 % (p/v), y el TGA con goma *Acacia* al 0.5% (p/v), 2 formulados a evaluar con las gomas y conidios de *H. citrifomis* (OPG-Hir-10) a una concentración de 1×10^7 conidios/mL; tratamiento HGA compuesto por la suspensión de goma *Acacia* al 0.5% (p/v) y conidios de *H. citrifomis* y HGH con goma de *H. citrifomis* al 0.5% (p/v) y conidios de *H. citrifomis* y como testigo absoluto se utilizó agua estéril. Todos los tratamientos se aplicaron por aspersión aproximadamente 0.3 mL sobre cada grupo de 15 adultos (no sexados) de *D. citri*, se emplearon 7 réplicas por cada tratamiento. Cada grupo de 15 insectos inoculados fueron puestos dentro de una arena experimental (recipientes plásticos de 150 mL, de 6 cm alto \times 8 cm ancho \times 5 cm largo, donde se colocó una esponja de dos centímetros de espesor saturada con agua destilada estéril para proporcionar humedad) a $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2.0 \text{ }^\circ\text{C}$ y 12h:12h luz/oscuridad. La mortalidad de los insectos se registró cada 3 días durante un periodo de 21 días, los datos fueron empleados para calcular la mortalidad y el tiempo letal medio (TL₅₀) de cada uno de los tratamientos.

En condiciones de campo se evaluaron los adherentes en dos experimentos independientes, en plantas de *Citrus sinensis* Osbeck 'Valencia' (Rutaceae), en la zona citrícola del municipio de Montemorelos, Nuevo León, México (25°17'12.69'' N, 99°55'39.99'' O), el primer bioensayo inició el 1 de Octubre de 2020 y finalizó el 22 de Octubre de 2020. Durante este periodo, la temperatura promedio fue de 23°C con humedad relativa del 69% y 3.0 mm de precipitación. Los tratamientos evaluados fueron los mismo que se utilizaron en el experimento a nivel de laboratorio (TA, TGA, TGH, HGH, HGA). Los adultos de *D. citri* se recolectaron en el mismo huerto usando para ello un aspirador bucal. Los insectos fueron dormidos e inoculados por aspersión de 0.3 mL, en cada repetición se usaron 15 adultos los cuales se colocaron en bolsas de malla (20 cm x 20 cm) y puestos en brotes libres de enemigos naturales de *D. citri*. El bioensayo se evaluó 21 días después.

El segundo experimento de campo inició el 6 de Octubre y finalizó el 27 de Octubre de 2021, en la misma zona citrícola de Montemorelos, Nuevo León, México. La temperatura promedio fue de 22.8 °C, 76% de humedad relativa y una precipitación de 3.3 mm. La preparación de los tratamientos y evaluación de la mortalidad sobre los adultos de *D. citri* se realizó de la misma manera que el primer experimento de campo, realizado en Octubre del 2020.

6.6 Evaluación de la efectividad de control biológico de los formulados a base de *H. citriformis* contra *D. citri* en laboratorio, invernadero y campo

6.6.1 Eficacia de formulados a base de *H. citriformis* contra adultos de *D. citri* en condiciones de laboratorio.

Conidios de *H. citriformis* a una concentración de 1×10^7 conidios/ml y como adherente goma de *Acacia* o goma de *Hirsutella*, además de aceite vegetal en polvo al 3% fueron los diferentes tratamientos usados en los bioensayos. Para cada tratamiento se usaron siete réplicas de 15 adultos/tratamiento de *D. citri*. Se evaluaron cinco tratamientos, control absoluto (TA), control con goma de *Acacia* y aceite vegetal en polvo (TGA), control con goma de *Hirsutella* y aceite vegetal en polvo (TGH), conidios formulados con goma de *Acacia* y aceite vegetal en polvo (HGA), y conidios

formulados con goma de *Hirsutella* y aceite vegetal en polvo (HGH). Los tratamientos se asperjaron directamente usando un mililitro de cada suspensión sobre cada grupo de 15 adultos de *D. citri*, y cada grupo fue puesto sobre una hoja de cítricos dentro de una arena experimental e incubadas durante 21 días a $28.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 12 h:12 h luz/oscuridad. La mortalidad de los insectos se registró cada tres días. Se usaron cuatro replicas por tratamiento, los datos fueron analizados para calcular el porcentaje de mortalidad y el tiempo letal medio (TL₅₀).

Para el porcentaje de mortalidad se utilizó la fórmula de corrección de Abbott (Abbott 1925):

$$\text{Corrección de Abbott} = \frac{(\% \text{ mortalidad del tratamiento} - \% \text{ mortalidad de control absoluto})}{100 - \% \text{ mortalidad de control absoluto}} \times 100$$

6.6.2 Eficacia de formulados a base de *H. citriformis* contra adultos de *D. citri* en condiciones de invernadero.

La evaluación de la eficacia de los conidios formulados de *H. citriformis* se determinó dentro de un invernadero del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico de México, Tecomán, Colima, México, empleando 12 plantas de naranja (*C. × sinensis*). El experimento inició el 28 de octubre y finalizó el 18 de noviembre de 2022. Se infestaron cinco brotes por planta con 10 adultos de *D. citri* por brote, y se confinaron usando una bolsa de malla (30 cm de alto × 28 cm de ancho). La infestación de insectos en los brotes se realizó por la mañana, antes de la aplicación de los formulados. Los tratamientos fueron: control absoluto (TA), control de goma *Hirsutella* (TG) y las cepas formuladas de *H. citriformis* FOP-Hir-03 (Tabasco), FOP-Hir-10 (Yucatán) y FOP-Hir-12 (Colima). Los conidios formulados se ajustaron a una concentración de 5×10^6 conidios/mL y se aplicaron 4 mL de tratamiento por brote durante la tarde con un aspersor manual. La mortalidad de adultos de *D. citri* se evaluó después de 21 días cuantificando el número de adultos muertos, adultos vivos (sin presencia de micosis) y adultos micosados. Los cadáveres se colocaron en cámaras húmedas ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 90% de humedad relativa) durante 10 días para verificar el desarrollo de micelio. La temperatura y la humedad relativa se determinaron diariamente mediante un higrómetro (Elitech RC-4HC; Elitech Technology Inc., San José, CA, EE. UU.) colocado en el dosel de la planta. El experimento consistió en un

diseño de bloques al azar con cinco replicas por tratamiento.

6.6.3 Eficacia de formulados a base de *H. citriformis* contra adultos de *D. citri* en condiciones de campo.

La efectividad de formulaciones a base de *H. citriformis* contra adultos de *D. citri* a nivel de campo se evaluó en dos experimentos independientes.

El primer experimento de campo se realizó en un huerto comercial de limón persa mexicano (*Citrus × latifolia*) ubicada en el municipio de Tecomán, Colima, México (18° 55'53.2'' N, 103° 51'51.6'' O) del 23 de marzo al 12 de abril del 2022. Un huerto de 187 plantas con edad promedio de 3 años, altura de 2 metros y sembrados con una separación de 3 metros entre cada planta. Los adultos de *D. citri* utilizados en este experimento fueron recolectados con la ayuda de un aspirador bucal del mismo huerto. Se aplicaron cinco tratamientos, tres formulaciones con cada una de las cepas (FOP-Hir-03, FOP-Hir-10 y FOP-Hir-12) 5×10^6 conidios/mL de concentración, empleando como adherente goma de *Hirsutella* y aceite vegetal en polvo como protector; un control sin el agente activo (TG) y un control absoluto (TA). Se emplearon 8 plantas para cada tratamiento y 6 brotes libres de enemigos naturales por árbol. Diez adultos de *D. citri* confinados en una bolsa de malla por repetición. Cada brote fue inoculado con 4 mL utilizando un aspersor manual con cada uno de los tratamientos. Después de 21 días de aplicación, se cuantificaron los insectos vivos y muertos dentro de cada bolsa de malla y los cadáveres se incubaron en cámara de humedad (25 °C ± 2 °C y 90% de humedad relativa) para evaluar el desarrollo de micelio. Los niveles de temperatura y humedad relativa se midieron cada cuatro horas durante el periodo del experimento.

El segundo experimento de campo se llevó a cabo el 28 de octubre y finalizó el 18 de noviembre de 2022. Este se realizó en un huerto de limón mexicano (*C. aurantiifolia*) en Tecomán, Colima, México (18°49'7.5'' N 103°48'33.6'' O). La efectividad de los formulados FOP-Hir-03, FOP-Hir-10 y FOP-Hir-12 se evaluó de manera similar a la descrita para el primer experimento, donde se utilizaron 10 adultos de *D. citri* en cada brote, seis brotes por árbol. y ocho árboles para cada tratamiento. Se aplicaron las mismas tres formulaciones a una concentración de 5×10^6 conidios/mL,

incluido un control sin el agente activo (TG) y un control absoluto (TA). Cada brote fue asperjado con cuatro 4 mL de cada tratamiento y la aplicación de la formulación se realizó por la tarde. La mortalidad se determinó 21 días después de la aplicación y los cadáveres fueron colocados durante 10 días en cámaras húmedas ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 90% de humedad relativa) con el fin de promover la presencia de micelio. Durante el período del bioensayo, los niveles de temperatura y humedad relativa se registraron con un higrómetro.

6.7 Análisis estadísticos

En los bioensayos de laboratorio, el tiempo letal medio de los tratamientos se calculó mediante la prueba de Kaplan-Meier. Los porcentajes de mortalidad fueron transformados con arcoseno para normalización. Los datos de mortalidad fueron ajustados utilizando la fórmula de corrección de Abbott, donde el valor de control absoluto se restó de todos los demás valores (Abbot 1925). Se utilizó ANOVA para analizar los datos de mortalidad de los experimentos y se empleó la prueba post hoc de Tukey a un nivel de significancia de $p \leq 0.05$ (IBM SPSS Statistics Version 22; SPSS, Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para analizar los datos de porcentaje de esporulación de los diferentes experimentos y donde los datos analizados no mostraron una normalidad, posteriormente se comparó mediante la prueba de Dunn, utilizando el software Graph Pad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU).

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización molecular de aislamientos de *Hirsutella* spp.

El análisis filogenético en base al gen de β -tubulina, mostró que las 11 cepas aisladas de *Hirsutella* sp. están estrechamente relacionadas entre sí y forman un nodo en común con secuencias del género *H. citriformis*. Los hongos originarios de Veracruz (OP- Hir-4 y OP-Hir-6), Yucatán (OP-Hir-10 y OP-Hir-11) y Tabasco (OP-Hir-3 y OP-Hir-7) tienen una similitud más estrecha agrupándose en el mismo clado (Figura 3).

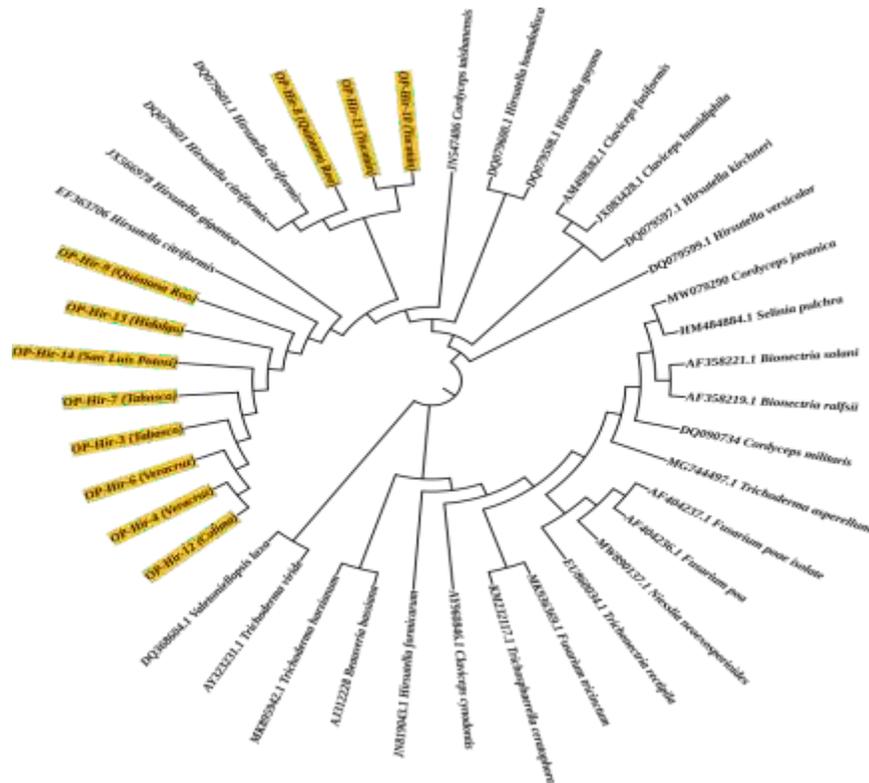


Figura 3. Árbol filogenético de las secuencias de β -tubulina de aislamientos de *H. citriformis* junto a secuencias de referencias obtenidas de NCBI. En color amarillo se destacan los aislamientos identificados en el presente trabajo.

En cuanto a la filogenia del gen 28S ARNr, se identificaron 10 aislamientos como *H. citriformis*, mientras que OP-Hir-03 (Tabasco) presentó una relación más estrecha con *H. rhossiliensis* (Simmons et al. 2015). Los aislamientos OP-Hir-04

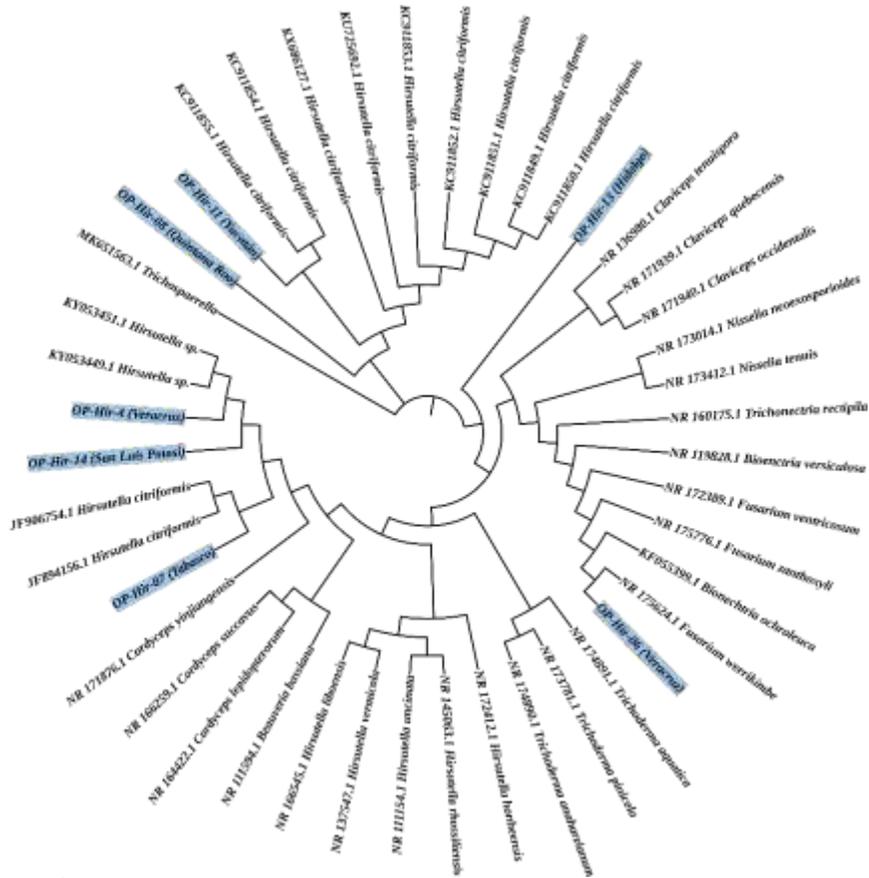


Figura 5. Árbol filogenético de las secuencias de la región ITS de aislamientos de *H. citriformis* junto a secuencias de referencias obtenidas de NCBI. En color azul se destacan los aislamientos identificados en el presente trabajo.

7.2 Evaluación de la colonización endofítica de *H. citriformis* en plantas de cítricos mediante distintos métodos de inoculación.

Los resultados de la capacidad endofítica por el método de cuña mostraron que *H. citriformis* y *B. bassiana* empleando una concentración de 1×10^7 conidios/cm², no fueron capaces de colonizar la planta, al utilizar esta técnica, e intentar recuperar estos hongos a las cuatro y ocho semanas a partir de los distintos tejidos de la planta, como son hojas superiores, hojas inferiores y tallo (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia de colonización de hongos entomopatógenos en diferentes segmentos de la planta *Citrus sinensis* (hojas superiores, hojas inferiores y tallo) a distintas semanas posterior a la inoculación de *H. citrifomis* y *B. bassiana* a una concentración de 1×10^7 conidios/cm² mediante el método de cuña.

Cepa	Tratamientos	Frecuencia de colonización en diferentes partes de la planta			
		n	Hojas superiores	Hojas inferiores	Tallo
<i>H. citrifomis</i>	4 semanas post inoculación	4	0/4	0/4	0/4
	8 semanas post inoculación	4	0/4	0/4	0/4
<i>B. bassiana</i>	4 semanas post inoculación	4	0/4	0/4	0/4
	8 semanas post inoculación	4	0/4	0/4	0/4

Por otra parte, al evaluar el método de inmersión de semilla en metil-celulosa al 2% se observó que *H. citrifomis* y *B. bassiana* no lograron ser recuperados de las primeras hojas de las plantas que germinaron de las semillas tratadas después de 4, 8 y 12 semanas a partir de nacimiento de las primeras hojas (Tabla 2).

Tabla 2 Frecuencia de colonización de hongos entomopatógenos en hoja de la planta *Citrus sinensis* a distintas semanas después de la inoculación de *H. citrifomis* y *B. bassiana* a una concentración de 1×10^7 conidios/mL mediante la inoculación de semillas recubiertas con metil-celulosa al 2% y su germinación.

Cepa	Tratamientos	n	Frecuencia de colonización en hojas
<i>H. citrifomis</i>	4 semanas post inoculación	4	0/4
	8 semanas post inoculación	4	0/4
	12 semanas post inoculación	4	0/4
<i>B. bassiana</i>	4 semanas post inoculación	4	0/4
	8 semanas post inoculación	4	0/4
	12 semanas post inoculación	4	0/4

Por último, se utilizó el método de inoculación de asperjado en plantas de limón mexicano (*Citrus aurantiifolia*) con una concentración de 1×10^8 conidios/mL de cada hongo. Los resultados no mostraron colonización, ya que *H. citrifomis* no pudo ser recuperada de hojas superiores ni hojas inferiores después del periodo de 12

semanas, mientras que *B. bassiana* solo se recuperó de las hojas inferiores de una de las cuatro plantas tratadas (25%) a las 12 semanas post inoculación foliar (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia de colonización de hongos entomopatógenos en diferentes segmentos de la planta *Citrus sinensis* (hojas superiores y hojas inferiores) a distintas semanas después de la inoculación de *H. citriformis* y *B. bassiana* a una concentración de 1×10^8 conidios/mL mediante el método de aspersión foliar.

Cepa	Tratamientos	n	Frecuencia de colonización en hojas	
			Hojas superiores	Hojas inferiores
<i>H. citriformis</i>	4 semanas post inoculación foliar	4	0/4	0/4
	8 semanas post inoculación foliar	4	0/4	0/4
	12 semanas post inoculación foliar	4	0/4	0/4
<i>B. bassiana</i>	4 semanas post inoculación foliar	4	0/4	0/4
	8 semanas post inoculación foliar	4	0/4	0/4
	12 semanas post inoculación foliar	4	0/4	1/4

7.3 Efectividad de formulados a nivel de laboratorio, invernadero y campo.

7.3.1 Evaluación de goma *Acacia* y goma de *Hirsutella citriformis* como adherente a nivel de laboratorio.

Los resultados de la evaluación de adherentes con goma *Acacia* y goma de *Hirsutella* mostraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control absoluto sobre la mortalidad de adultos de *D. citri* en condiciones de laboratorio ($F_{4,20} = 3.394$; $p < 0.028$). La mayor mortalidad se observó con el tratamiento HGH (conidios de *H. citriformis* y goma de *Hirsutella* al 0.5%), que infectó y mató al 50.9% de los insectos tratados, mientras que los tratamientos HGA (conidios de *Hirsutella* y goma *Acacia*), TGH (goma de *Hirsutella* sin conidios) y TGA (goma de *Acacia* sin conidios), causaron una mortalidad del 42.5%, 39.6% y 20.8%, respectivamente (Figura 6).

El tratamiento HGH, presentó un tiempo letal medio de 13.2 días (IC = 11.3 – 15) siendo el más bajo en comparación con los demás tratamientos (Tabla 4).

Tabla 4. Tiempo letal medio (TL50) de los adultos de *D. citri* expuestos a los distintos tratamientos.

	Tratamientos				
	TA	TGA	TGH	HGA	HGH
Días	16.5	17.2	15.0	16.3	13.2
intervalo de confianza	(15.7-17.3)	(15.8-18.5)	(13.5-16.5)	(15.3-17.4)	(11.3-15.0)

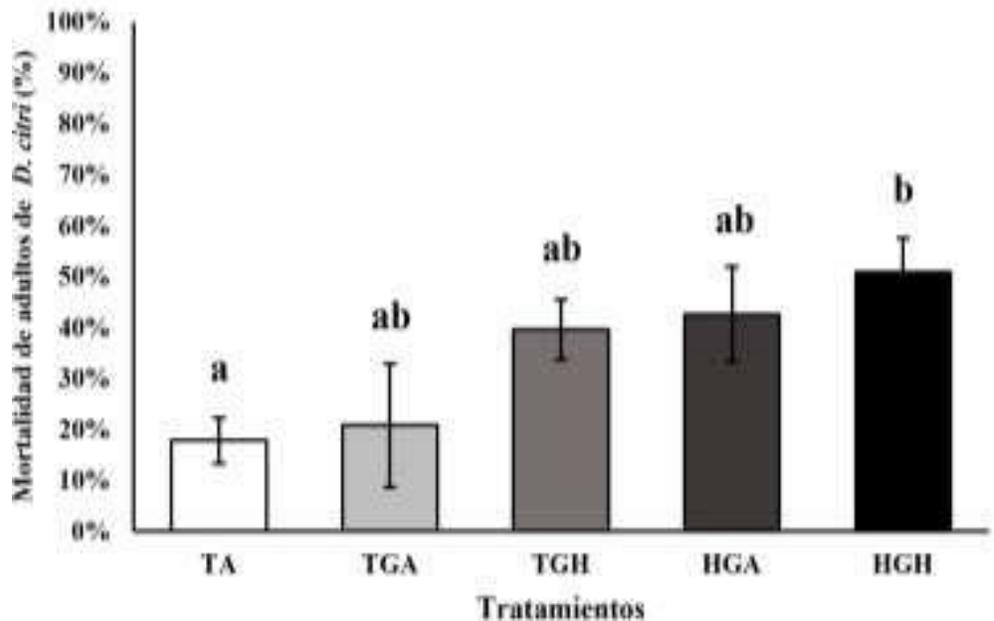


Figura 6. Promedio del porcentaje de mortalidad de adultos de *D. citri* en condiciones de laboratorio después de la aplicación mediante aspersión de conidios de *H. citriformis* y gomas como adherentes. Control absoluto = TA, control goma *Acacia* = TGA, control goma *Hirsutella* = TGH, conidios de *H. citriformis* con goma *Acacia* = HGA, conidios de *H. citriformis* con goma *Hirsutella* = HGH. Letras diferentes indican diferencias significativas y las barras indican el error estándar de la media (prueba de Tukey).

7.3.2 Evaluación de goma *Acacia* y goma de *Hirsutella citriformis* como adherente a nivel de campo.

En los resultados de la evaluación de adherentes en condiciones de campo realizado en octubre de 2020, se observó que los tratamientos con conidios y goma de *Hirsutella* (HGH) y el control de goma de *Hirsutella* (TGH) mostraron mayor mortalidad contra adultos de *D. citri* (79.3% y 55.3%, respectivamente), siendo estos resultados estadísticamente significativos en comparación con los demás tratamientos ($F_{4,25} = 48.7; p < 0.001$). Además, al emplear conidios y goma *Acacia* (HGA) se observó una mortalidad de 34.7% de insectos mientras que el control con goma *Acacia* solo

presentó una mortalidad de 4.5% muy similar a la del control absoluto (Figura 7).

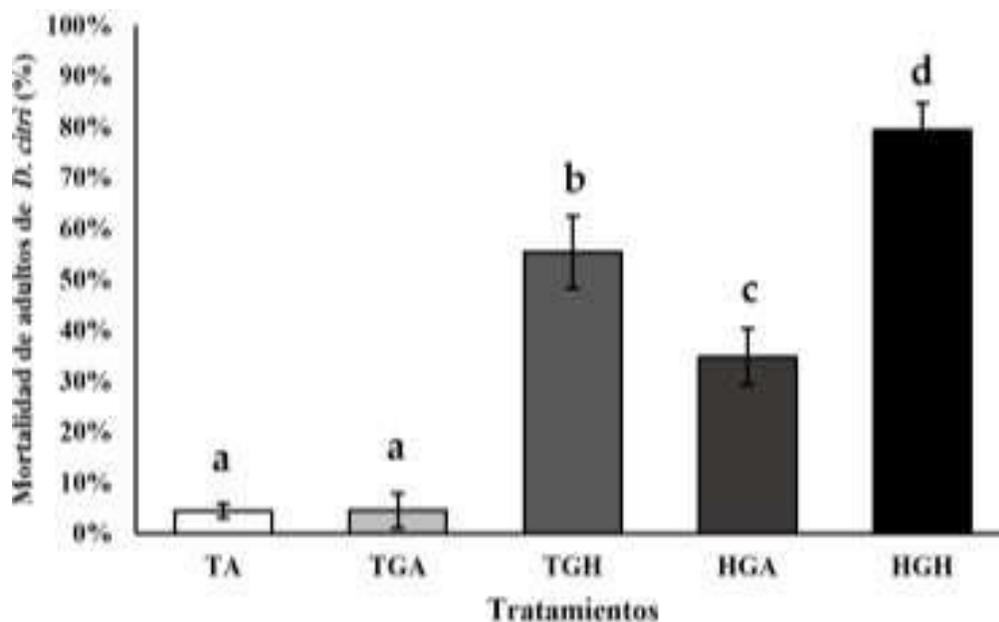


Figura 7. Promedio de mortalidad de los adultos de *D. citri* en condiciones de campo después de la aplicación mediante aspersión de conidios de *H. citriformis* y gomas como adherentes. Control absoluto = TA, control goma *Acacia* = TGA, control goma *Hirsutella* = TGH, formulación con goma *Acacia* = HGA, formulación con goma *Hirsutella* = HGH, el control goma *Hirsutella* (TGH). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas y las barras indican el error estándar de la media (prueba de Tukey).

Los resultados del segundo experimento en campo, realizados en octubre de 2021, fueron similares a los obtenidos en octubre de 2020, donde el tratamiento con conidios y goma de *Hirsutella* (HGH) al 0.5% fue el que resultó en la mayor mortalidad de adultos de *D. citri* (59.7%), el control con goma de *Hirsutella* (TGH) causó un 49.5% y los conidios con goma de *Acacia* un 44.7% de mortalidad sobre los insectos (Figura 8), observándose diferencias significativas entre los tratamientos y el control absoluto ($F_{4,10} = 11.961$; $p < 0.001$).

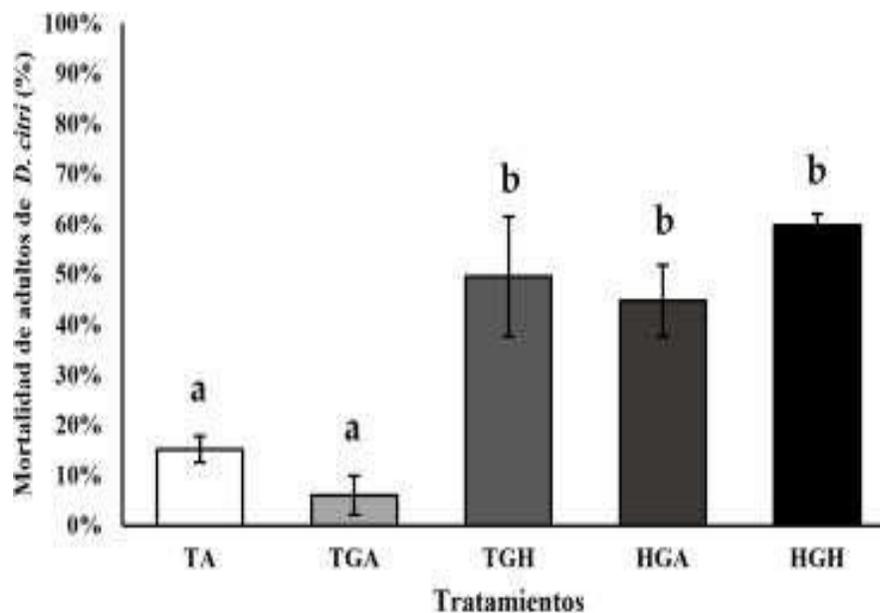


Figura 8. Promedio de mortalidad de los adultos de *D. citri* en condiciones de campo después de la aplicación mediante aspersión de conidios de *H. citrifomis* y gomas como adherentes. Control absoluto = TA, control goma de *Acacia* = TGA, control goma de *Hirsutella* = TGH, formulación con goma de *Acacia* = HGA, formulación con goma de *Hirsutella* = HGH, el control goma de *Hirsutella* (TGH). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas y las barras indican el error estándar de la media (prueba de Tukey).

7.3.3 Efectividad de formulados de *Hirsutella citrifomis* contra *Diaphorina citri* a nivel de laboratorio.

En condiciones de laboratorio, se observó que la formulación FOP-Hir-10GH fue la más efectiva significativamente ($F_{4,19} = 8.0, p < 0.001$) controlando a adultos de *D. citri* con mortalidad del 63.5% durante los 21 días evaluados, en comparación con el control absoluto (TA). Además, la goma de *H. citrifomis* sin conidios (TGH) causó una mortalidad del 42.2% de los adultos de *D. citri*, lo que demostró que la goma por si sola, posee toxicidad directa sobre estos insectos, similar a lo observado en los experimentos utilizando las gomas como adherentes en condiciones de laboratorio y campo mencionados anteriormente. Los tratamientos con goma de *Acacia* sin conidios (TGA) y la formulación FOP-Hir-10GA no presentaron diferencias significativas, en comparación con TA (Figura 9). El tratamiento FOP-Hir-10GH tuvo un tiempo letal medio (TL₅₀) de 9 días (IC₉₅ = 6.2–11.7), la cual fue menor que el tiempo letal del tratamiento con TGH, que fue de 14.7 días (IC₉₅ = 12.9–16.5) (Tabla 5).

Tabla 5. Tiempo letal medio (TL50) de los adultos de *D. citri* expuestos a las distintas formulaciones en condiciones de laboratorio.

	TA	TGA	TGH	FOP-Hir-10GA	FOP-Hir-10GH
Días	19.1 ± 0.6	19.1 ± 0.6	19.1 ± 0.6	19.1 ± 0.6	19.1 ± 0.6
Intervalo de confianza	(17.9- 20.3)	(16.9-19.5)	(12.9 - 16.5)	(17.0-19.9)	(6.2 - 11.7)

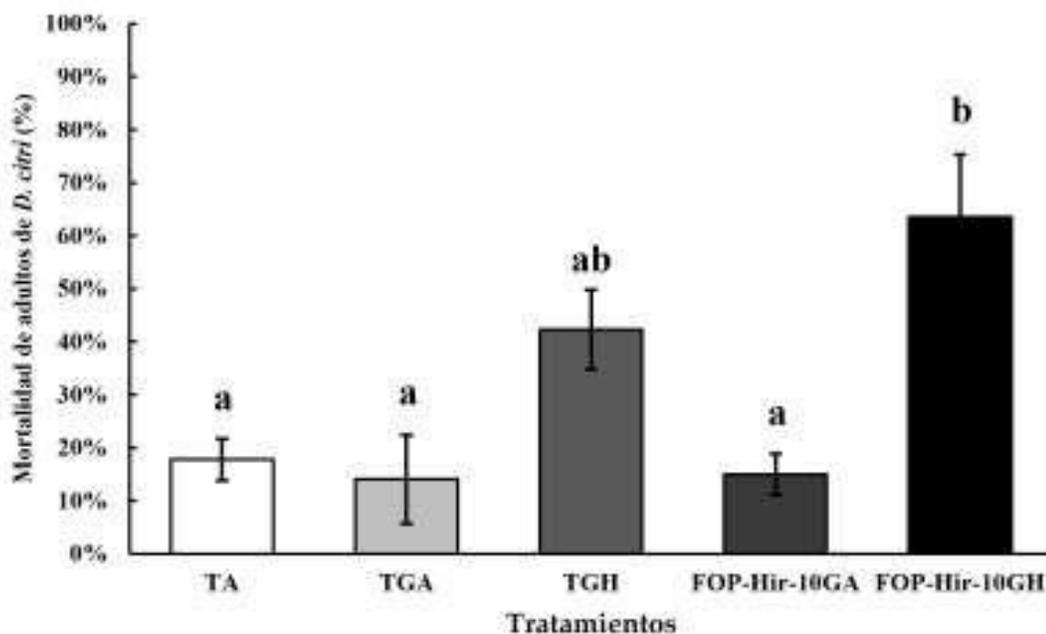


Figura 9. Porcentajes de mortalidad de adultos de *D. citri* después de la aplicación por aspersión de conidios formulados de *H. citriformis* (1×10^7 conidios/mL), en condiciones de laboratorio. TA = control absoluto; TGA = goma de *Acacia* + aceite vegetal en polvo; TGH = goma de *Hirsutella* + aceite vegetal en polvo; FOP-Hir-10GA = conidios de *Hirsutella* + goma de *Acacia* + aceite vegetal en polvo; y FOP-Hir-10GH = conidios de *Hirsutella* + goma de *Hirsutella* + aceite vegetal en polvo. Las barras indican el error estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (prueba de Tukey < 0.05).

7.3.4 Evaluación de formulados de *Hirsutella citriformis* contra *Diaphorina citri* a nivel de invernadero.

Al evaluar la eficacia de los conidios de *H. citriformis* formulados en experimentos de invernadero, se observaron diferencias significativas entre las formulaciones y el control absoluto ($F_{4,19} = 8.6$; $p \leq 0.05$). La mayor mortalidad de adultos de *D. citri* se observó con el formulado FOP-Hir-12, causando la mortalidad del 84.6% de los insectos tratados. Las formulaciones FOP-Hir-03 y FOP-Hir-10

mostraron una mortalidad del 55.7% y 56.1%, respectivamente sobre los adultos de *D. citri*. Además, el tratamiento TG (goma de *Hirsutella* sin conidios) causó una mortalidad del 49.0% de los adultos de *D. citri*, con un efecto similar a lo observado en los experimentos en laboratorio (Figura 10A).

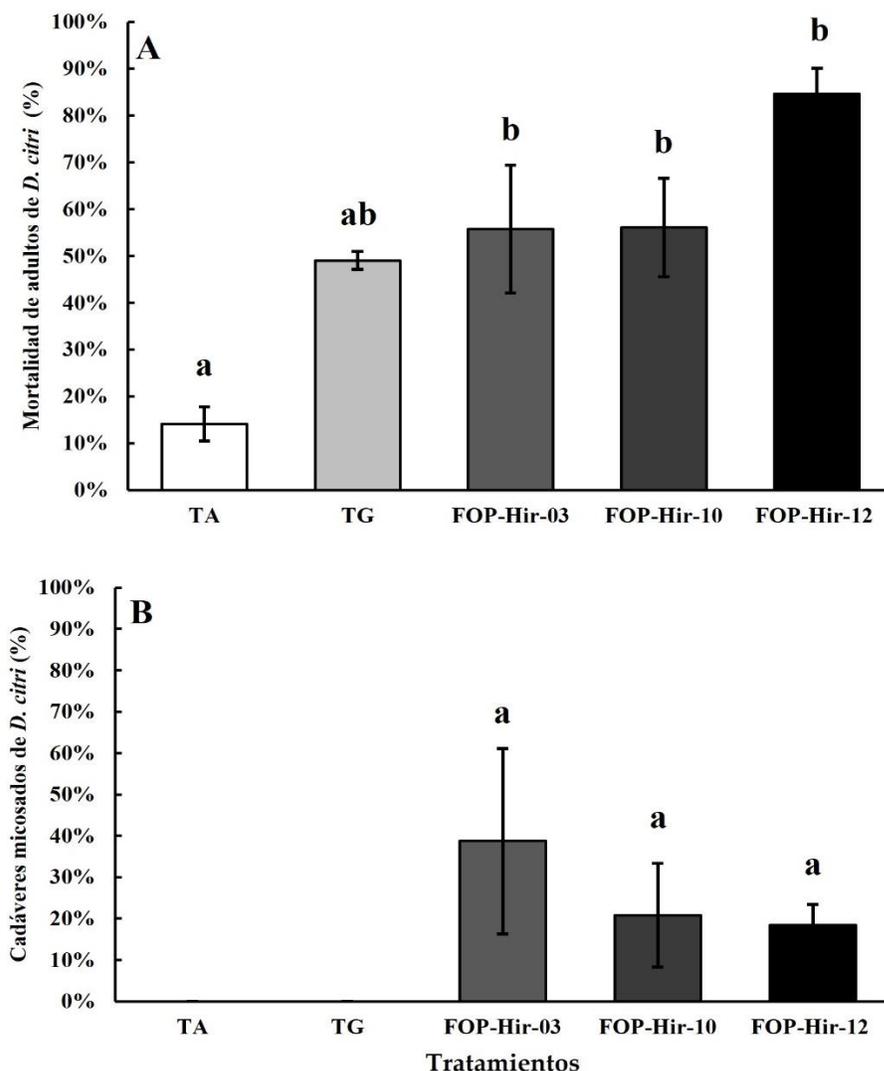


Figura 10. Porcentajes de mortalidad y promedios de desarrollo del micelio aéreo (esporulación) causados por conidios formulados de *H. citriformis* (5×10^6 conidios/mL), aplicado por aspersión sobre *D. citri* adultos en condiciones de invernadero. TA = control absoluto; TG = control sin agente activo; FOPHir-03 = formulación de cepa OP-Hir-03; FOP-Hir-10 = formulación de cepa OP-Hir-10; y FOP-Hir-12 = Formulación de la cepa OP-Hir-12. (A) Porcentaje promedio de mortalidad. Las barras indican el error estándar (Tukey $\alpha < 0,05$) y diferentes letras minúsculas indican una diferencia estadística significativa entre tratamientos. (B) Mediana del porcentaje del desarrollo medio del micelio aéreo. Diferentes letras indican una diferencia estadísticamente significativa (α de Dunn < 0.05) en el porcentaje de esporulación del hongo en los insectos infectados, mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

No se observaron diferencias significativas ($H(4) = 8.226, p = 0.0836$) al comparar la presencia de cadáveres micosados entre tratamientos. La mayor de cantidad de cadáveres micosados fue presentada por el tratamiento FOP-Hir-03, el cual micosó al 38.7% de los cadáveres, mientras que los tratamientos FOP-Hir-10 y FOP-Hir-12 solo micosaron 20.8% y 18.4% de los insectos muertos, respectivamente (Figura 10B).

7.3.5 Evaluación de formulados de *Hirsutella citriformis* contra *Diaphorina citri* a nivel de campo.

La mortalidad de los adultos de *D. citri* tratados con formulados de *H. citriformis* en el bioensayo de campo fue significativamente mayor que el control absoluto durante el experimento de marzo de 2022. El tratamiento FOP-Hir-12 causó mayor mortalidad (67.3%) de los adultos de *D. citri* ($F_{4,14} = 44.2; p \leq 0.05$). Los tratamientos FOP-Hi-03 y FOP-Hir-10 ocasionaron mortalidad del 57.0 % y 54.2 % en adultos de *D. citri*, respectivamente. La goma de *Hirsutella* (TG) mostró un efecto similar al observado en experimentos de laboratorio y de invernadero, causando una mortalidad del 41.2% entre los adultos tratados con *D. citri* (Figura 11).

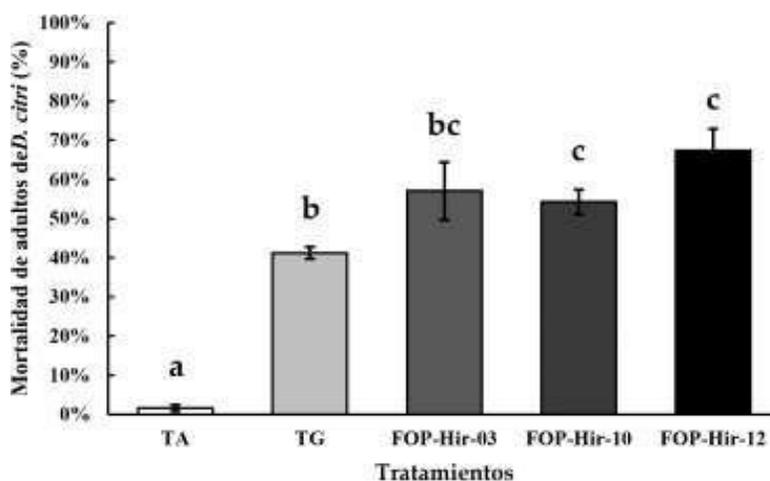


Figura 11. Porcentajes de mortalidad de adultos de *D. citri* después de la aplicación por aspersión de conidios formulados de *H. citriformis* (5×10^6 conidios/mL) en condiciones de campo. Control absoluto = TA; goma de Acacia + goma de *Hirsutella* + control de aceite vegetal en polvo = TG; conidios FOP-Hir- 03 + goma de *Hirsutella* + aceite vegetal en polvo = conidios formulados con OP-Hir-03; conidios FOP-Hir- 10 + goma de *Hirsutella* + aceite vegetal en polvo = conidios formulados con OP-Hir-10; Conidios FOP-Hir- 12 + goma de *Hirsutella* + aceite vegetal en polvo = conidios formulados con OP-Hir-12. Las barras indican el error estándar (Tukey $\alpha < 0.05$), y diferentes letras minúsculas indican una diferencia estadística significativa entre tratamientos.

Durante el período experimental, no fue posible detectar el desarrollo de micelio aéreo de *H. citrifomis* en cadáveres de *D. citri* recolectados en áreas de campo tratadas.

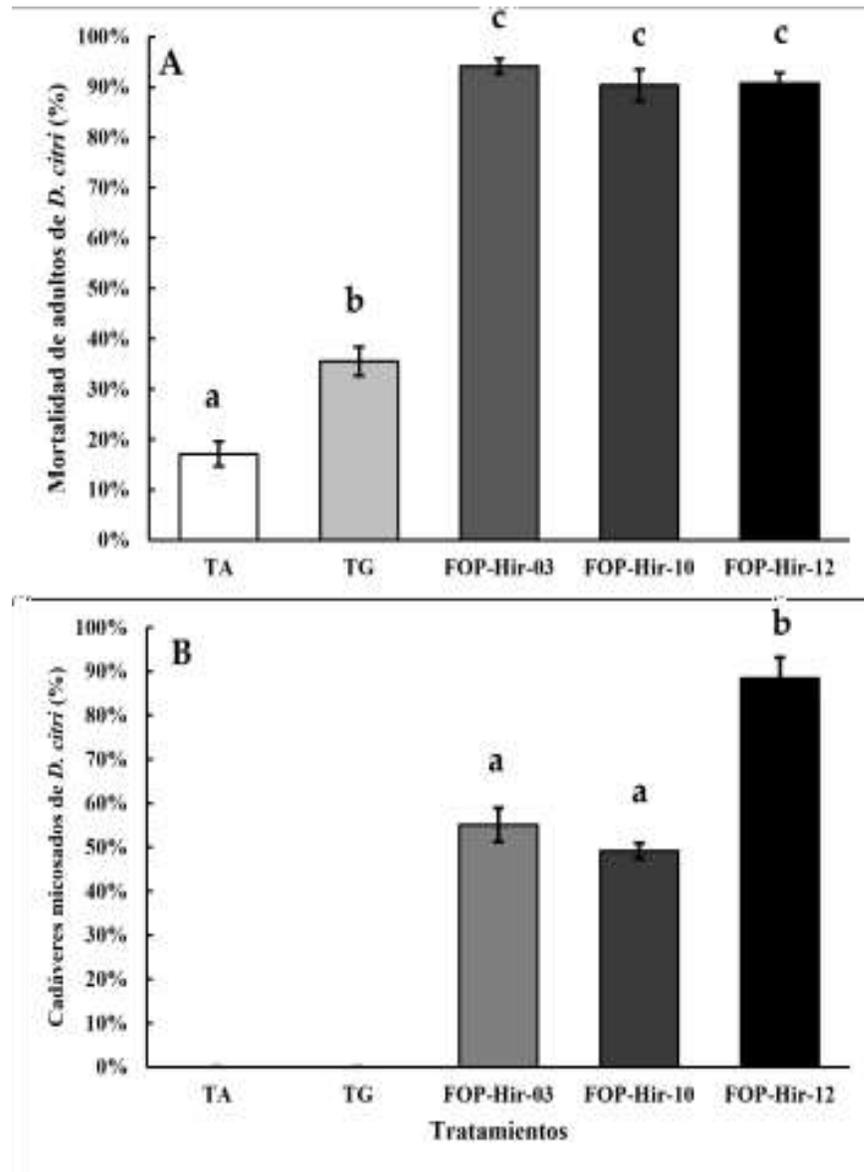


Figura 12. Porcentajes de mortalidad y promedios de desarrollo del micelio aéreo (esporulación) causados por conidios formulados de *H. citrifomis* (5×10^6 conidios/ml), aplicado por aspersión sobre *D. citri* adultos en condiciones de campo. TA = control absoluto; TG = control sin agente activo; FOPHir-03 = formulación de cepa OP-Hir-03; FOP-Hir-10 = formulación de cepa OP-Hir-10; y FOP-Hir-12 = Formulación de la cepa OP-Hir-12. **(A)** Porcentaje promedio de mortalidad. Las barras indican el error estándar. (Tukey $\alpha < 0,05$) y diferentes letras minúsculas indican una diferencia estadística significativa entre tratamientos. **(B)** Mediana del porcentaje del desarrollo medio del micelio aéreo. Diferentes letras indican una diferencia estadísticamente significativa (α de Dunn < 0.05) en el porcentaje de esporulación del hongo en los insectos infectados, mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

En el segundo bioensayo, realizado en octubre de 2022, siguiendo los mismos tratamientos y dosis que en el primer experimento, los conidios formulados de cepas de *H. citrifomis* (5×10^6 conidios/mL) causaron una mortalidad que osciló entre 90.7% y 94.0%, significativamente mayor en comparación que la del control (17.0%) ($F_{4,39} = 85.4$; $p \leq 0.05$), mientras que el tratamiento con TG causó mortalidad del 35.4%. Además, el control absoluto presentó mortalidad del 17.0 % (figura 12A). La micosis de los cadáveres de *D. citri* fue de 88.4% en el tratamiento FOP-Hir-12, mientras que para los tratamientos FOP-Hir-10 y FOP-Hir-03, fue de 55.0% y 49.1% respectivamente (Figura 12B).

8. DISCUSIÓN

La identificación de los aislamientos, basada en las características morfológicas observadas, principalmente los sinemas, forma de la fiálide y de los conidios, indican que todos los aislados pertenecen al género de *Hirsutella* (Reddy et al. 2020). Sin embargo, hay autores que argumentan que las características morfológicas de este género son insuficientes para determinar relaciones entre especies (Simmons et al. 2015). Por lo cual, en el presente estudio se realizaron los análisis filogenéticos de los genes β -tubulina, ITS y 28s ARNr con el objetivo de determinar estas relaciones interespecíficas.

Al emplear las regiones ITS para el análisis filogenético solo dos de los 11 aislamientos fueron asociados a la especie *H. citriformis* mientras que el resto de las secuencias solo se relacionó al género *Hirsutella*, esto pudo deberse a que las regiones ITS pueden generar incongruencias en los análisis filogenéticos como lo ha reportado Simmons et al. (2015). Por otra parte, con el análisis filogenético de la región 28s ARNr de estas muestras, 10 de ellas presentaron gran similitud con las especies de *H. citriformis* utilizadas como referencia, solo la cepa OP-Hir-03 presentó una relación más estrecha hacia la especie de *H. rhossiliensis*, pero sus características morfológicas la asocian a la especie *H. citriformis*. Con base en los análisis filogenéticos empleando del gen de β -tubulina, todas las muestras lograron ser asociadas e identificadas como *H. citriformis*, por la estrecha relación filogenéticas que se observaron con cepas de referencias obtenidas del NCBI. Además, se encontró una similitud más estrecha entre las cepas de Veracruz, Yucatán y Tabasco, que podría representar algún tipo de patrón en relación con su distribución geográfica (Walsh et al. 2010).

Respecto a la capacidad de colonización endofítica de *H. citriformis* en plantas de cítricos, se demostró que este hongo no fue capaz de establecerse dentro de las plantas evaluadas, al menos mediante los métodos analizados en este trabajo. Esto puede deberse a que *H. citriformis*, en una etapa de su ciclo de vida, depende de un insecto hospedero para su desarrollo (patógeno obligado), lo cual afectaría su posible establecimiento como endófito en estas plantas.

Contrario a esto, existen varios reportes en los cuales se cita que *B. bassiana* (hongo saprófito con capacidad de parasitar a diferentes artrópodos) tiene el potencial de colonizar todas las partes de la planta sin importar el método de inoculación empleado (Brownbridge et al. 2012; Behie y Bidochka 2015; Qayyum et al. 2015).

Nuestros resultados difieren de dichos investigadores, ya que solo nos fue posible endofitar a *B. bassiana* al aplicarla por asperjado y otros investigadores usando la misma cepa, fueron capaces de endofitar plantas de maíz, introduciendo al hongo en las semillas (Kuzhuppillymyal-Prabhakarankutty et al. 2020). Sin embargo, Bamisile et al. (2020) mediante aspersión foliar, reportaron la colonización de tres cepas de *B. bassiana* y una de *M. anisopliae* (1×10^8 conidios/mL) hasta por 56 días en hojas de plantas de *Citrus limon* con edades de 3 meses de germinación. Además, al inocular a *H. citriformis* y a *B. bassiana* (PTG4) en semillas de *Citrus × sinensis* tratadas con metil-celulosa al 2% y una concentración de conidios de 1×10^7 conidios/mL, no se logró recuperar a ninguno de los dos hongos después de 4.8 o 12 semanas posterior a la germinación de las semillas. Contrario a lo reportado por Kuzhuppillymyal-Prabhakarankutty et al. (2020), donde empleando este mismo método de inoculación y logró recuperar a *B. bassiana* (GHA), *B. bassiana* (PTG4) y *B. bassiana* (PTG6) después de 14 días post germinación de las plantas de maíz.

Por otra parte, la inoculación de *H. citriformis* y *B. bassiana* por aspersión foliar en plantas de limón mexicano (*Citrus aurantiifolia*) demostró que solo *B. bassiana* tuvo la capacidad de establecerse como endófito siendo detectada en hojas inferiores a las 12 semanas. Este resultado valida reportes que han demostrado la capacidad de colonización endofítica de *B. bassiana* en plantas de cítricos reportándose hasta 12 semanas post inoculación en estudios realizados por Bamisile et al. (2019). En el caso de *H. citriformis* a la actualidad no existen reportes de colonización endofítica en plantas de cítricos.

En los bioensayos de laboratorio realizados con gomas como adherentes, los tratamientos que incluyeron conidios formulados con ambas gomas (HGH y HGA), mostraron patogenicidad contra los adultos de *D. citri*, además observamos que la goma producida por *H. citriformis* (TGH) por sí sola, causó la mortalidad del 39.6% de los insectos, indicando así que esta goma parece tener efectos nocivos sobre

insectos adultos de *D. citri*. La mortalidad en adultos de *D. citri* lograda con un tiempo letal medio de 13.2 días por la cepa OP-Hir-10 aplicada por aspersión con goma de *H. citrifomis* fue menor (50%) que la reportada en ensayos de laboratorio después de probar ocho cepas de *H. citrifomis* aplicadas por contacto, cuya mortalidad de adultos de *D. citri* fue de entre 50% a 88% (Pérez-González et al. 2015b).

Por otra parte, los dos experimentos independientes realizados en campo para evaluar las gomas como adherentes, mostraron resultados muy similares entre sí, la mortalidad provocada por los tratamientos con conidios y goma de *Hirsutella* (HGH) fue mayor (69.0 % - 79.0%) que la reportada por Pérez-González et al. (2016) al evaluar cuatro cepas de *H. citrifomis* y goma de *Acacia* al 1% aplicadas por aspersión donde se registró una mortalidad de 35.7% a 51.0% en adultos de *D. citri* en condiciones de semi- campo y similar a los tratamientos con conidios y goma de *Acacia* (HGA) donde se obtuvo una mortalidad de 44.7% de insectos. Además, se observó un efecto similar al de los ensayos de laboratorio con mortalidad de la goma de *Hirsutella* (TGH) mostrándose una mortalidad de alrededor del 50% de adultos de *D. citri*. La cantidad limitada de cadáveres micosados de insectos infectados puede estar relacionado con las condiciones ambientales del experimento, alta temperatura (31.5 °C) y baja humedad relativa la cual solamente permitió que *H. citrifomis* infectara y matara a los adultos de *D. citri*, pero no para que el hongo desarrollara micelio aéreo después de la muerte de los insectos. De manera similar, durante otras pruebas de campo se informó una baja micosis en el campo bajo condiciones similares de humedad relativa (Pérez-González et al. 2020). En base a los resultados obtenidos, la goma de *Hirsutella* se consideró la mejor opción para la formulación por su compatibilidad con los conidios de *H. citrifomis* y al efecto sinérgico que presentó sobre los adultos de *D. citri*.

En este trabajo, se evaluó la efectividad de formulaciones con conidios de *H. citrifomis* como ingrediente activo, goma de *Hirsutella* como adherente y aceite vegetal en polvo como protector para los conidios. Flores-Villareal et al. (2023), cita que los conidios se mantienen viables al menos durante 90 días en almacenamiento a 25° C y al menos 120 días a temperaturas de 4°C. El formulado FOP-Hir-10GH al ser evaluado a nivel laboratorio, obtuvo la mayor mortalidad (63.5%) con un tiempo letal

medio (TL₅₀) de 9 días, mientras que la goma de *Hirsutella* alcanzó 42.2% de mortalidad con un tiempo letal medio de 14.7 días. El efecto insecticida de la goma *Hirsutella* puede deberse a la producción de toxinas, como la Hirsutelina A (HtA), la Hirsutelina B (HtB), el ácido ftálico, las ribotoxinas o algunos exopolisacáridos como lo han reportado varios autores (Liu et al. 1995; Quereshi et al. 2007; Li et al. 2010; Herrero-Galan et al. 2013; Ramachadran et al. 2013; Corallo et al. 2021).

Los resultados obtenidos en el bioensayo en invernadero demostraron que los tratamientos FOP-Hir-3, FOP-Hir-10 y FOP-Hir-12 causaron 55.7%, 56.1% y 84.6% de mortalidad de adultos de *D. citri*, respectivamente, aquí el porcentaje de cadáveres micosados obtenido fue bajo (18.4% a 38.7%) debido a que las condiciones climáticas (25.7 °C ± 1 °C y 93.0% de humedad relativa) no permitieron el desarrollo del hongo durante el período de evaluación. Estos resultados son similares con los reportados por Ullah et al. (2018), mostrando que después de aplicar *Isaria fumosorosea* y *B. bassiana* en condiciones de invernadero a concentración de 1×10⁸ conidios/mL, la mortalidad observada de adultos de *D. citri* fue del 72.1% y del 61.2% respectivamente. Además, el porcentaje de cadáveres micosados observados fue de 52.6% y 38.4%, para cada hongo. Resultados similares se han observado en adultos de *D. citri* tras aplicar conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae* (1 × 10⁷ conidios/mL), alcanzando mortalidad del 51.0% y 78.9%, respectivamente (Fernandes et al. 2018). Además, la virulencia de los conidios de *H. citrififormis* (5 × 10⁶ conidios/mL) contra adultos de *D. citri* fue mayor que la de otros hongos entomopatógenos, donde se observó 70.0% de mortalidad de *D. citri* después de aplicar de 10⁷ a 10⁸ conidios/mL de *B. bassiana*. NCIM 1216, *B. bassiana* 2067, *C. fumosorosea* Wize IF-171201 y *M. anisopliae* 2411 (Ullah et al. 2018).

En los bioensayos en campo, las formulaciones con diferentes cepas de *H. citrififormis* mostraron una mortalidad de 54.2% a 94.0% sobre adultos de *D. citri*, lo que puede estar relacionado con una variabilidad genética de las cepas evaluadas que se asocia con alta patogenicidad y virulencia, como se observa en muchos patógenos como *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Hoy et al. 2010). Además, la goma de *Hirsutella* aplicada como control, mató alrededor del 41.2% de los insectos adultos en campo, resultado similar a lo observado en condiciones de laboratorio e invernadero. En el

primer experimento de campo, la presencia de cadáveres micosados se vio afectada por las condiciones ambientales, principalmente por la baja temperatura de 21.5 °C y una humedad relativa de 73.5%, ya que la temperatura óptima para el crecimiento de *H. citrifomis* es 25°C (Boucias et al. 2007). Así mismo, se ha reportado que la presencia de cadáveres micosados se ve afectada durante la primavera y verano debido a niveles subóptimos de humedad relativa para *H. citrifomis* (Hall et al. 2012). En el segundo experimento, las condiciones ambientales (25.7 °C y 72.5% de humedad relativa) permitieron que se desarrollara el hongo en los cadáveres, pues se observó un gran porcentaje de insectos micosados (55.0% a 88.4%). La mortalidad de *D. citri* lograda, utilizando las formulaciones FOP-Hir-3, FOP-Hir-10 y FOP-Hir-12 en campo, fue similar a la reportada previamente en ensayos de campo, donde se usó goma de *Hirsutella* en la formulación, causando mortalidad del 65.8% al 80.0% en dos experimentos (Pérez-González et al. 2020).

Por otra parte, Pérez-González et al. (2016a) en su bioensayo de semicampo, reportaron que las diferentes cepas de *H. citrifomis* formulada con goma de *Acacia* al 1.0% y asperjadas sobre adultos de *D. citri* en un huerto de limones persa, causó una mortalidad del 35.7% al 51.0%, la cual fue menor que los resultados obtenidos en nuestros bioensayos. Saldarriaga-Ausique et al. (2017) reportan que al aplicar 2.5×10^6 conidios/mL de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 obtuvieron una mortalidad de 82.5%, mientras que la aplicación de 5×10^6 conidios/mL de *B. bassiana* ESALQ-PL63 causó mortalidad de 82.3% en adultos de *D. citri* en un huerto comercial de cítricos, similar a lo reportado en este trabajo. Sin embargo, otros autores han reportado una tasa de mortalidad de adultos de *D. citri* de 42.0%, 50.0% y 50.0% aplicando en campo en concentraciones de 2×10^{13} conidios/hectárea *I. fumosorosea*, *B. bassiana* y *M. anisopliae*, respectivamente (Lezama-Gutiérrez et al 2012).

Los resultados obtenidos en invernadero y campo demuestran que la “formulación base” (aceite vegetal en polvo y goma de *Hirsutella*) es compatible con las cepas evaluadas y no afecta su patogenicidad de los hongos contra los adultos de *D. citri*. Además, se ha reportado la ausencia de efectos adversos de *H. citrifomis* sobre depredadores como *Chrysoperla rufilabris* Burmeister (Neuroptera: Chrysopidae), e *Hippodamia convergens* Guérin-Ménéville (Coleoptera:

Coccinellidae) (Perez-González et al. 2016b), demostrando así que su aplicación en formulaciones contra los adultos de *D. citri* minimizan el impacto sobre los organismos benéficos y aumentan la mortalidad contra el insecto plaga y con ello nos es posible asumir que los conidios de *H. citriformis* en formulado, pueden ser aplicados de manera segura en un programa de manejo integrado para combatir a *D. citri* por medio de control biológico en México.

9. CONCLUSIONES

- Todos los aislamientos fueron identificados como *H. citrifomis* mediante el marcador molecular de β -tubulina.
- *H. citrifomis* no posee la capacidad de colonizar plantas de *Citrus* \times *sinensis* L al inocularlos mediante los métodos de cuña, semilla con metil-celulosa, asperjado foliarmente.
- La goma de *Hirsutella* posee un efecto bionsecticida sobre adultos de *D. citri* a nivel de laboratorio, invernadero y campo.
- Todas las formulaciones evaluadas demostraron controlar las poblaciones de adultos de *D. citri* a nivel de laboratorio, invernadero y campo.
- El uso de aceite vegetal en polvo y goma de *Hirsutella* son componentes compatibles que no afectan la patogenicidad de los conidios de *H. citrifomis*.

10 PERSPECTIVAS

- Caracterizar la goma de *H. citrifomis* con el fin de identificar los componentes que causan toxicidad sobre los adultos de *D. citri*.
- Evaluar la patogenicidad de la goma de *Hirsutella* sobre los diferentes instares ninfales de *D. citri*.
- Optimizar el escalamiento de la producción y rendimiento de goma de *Hirsutella citrifomis* para su uso como posible bioinsecticida.
- Evaluar la compatibilidad de las formulaciones con insecticidas químicos para un mejor manejo integrado de plagas.

11. PRODUCTOS ENTREGABLES



Article

Adult *Diaphorina citri* Biocontrol Using *Hirsutella citriformis* Strains and Gum Formulations

Servando H. Cantú-Bernal ¹ , Ricardo Gomez-Flores ¹, Rosa A. Flores-Villareal ^{1,2} , Alonso A. Orozco-Flores ^{1,3} , César I. Romo-Sáenz ¹, Roberto Montesinos-Matías ², Marco A. Mellín-Rosas ², Jorge A. Sánchez-González ², Orquidea Pérez-González ^{1,4*}  and Patricia Tamez-Guerra ^{1,4*} 

- ¹ Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología e Inmunología, Avenida Pédrito de Alba s/n, Ciudad Universitaria, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza 66455, Nuevo León, México; scantub@uanl.edu.mx (S.H.C.-B.); ricardo.gomez@uanl.edu.mx (R.G.-F.); rosa.flores@uanl.edu.mx (R.A.F.-V.); alozorco@uanl.edu.mx (A.A.O.-F.); romos@uanl.edu.mx (C.I.R.-S.); montesinos@uanl.edu.mx (R.M.-M.); marco.mellin@uanl.edu.mx (M.A.M.-R.); sanchez@uanl.edu.mx (J.A.S.-G.)
- ² Centro Nacional de Referencia de Control Biológico—CNRE Dirección General de Sanidad Vegetal-SIRNASICA-SADIR, Km 1.5 Carretera Tuxtla-Tehuacán-Fotocita PFOC, Col. Tepicay, Tecuacán 20150, Colima, México; montesinos@cnrcbiol.mx (R.M.-M.); marco.mellin@sansepa.gov.mx (M.A.M.-R.); sanchez@sansepa.gov.mx (J.A.S.-G.)
- ³ Correspondence: opozorco@uanl.edu.mx (A.A.O.-F.); patricia.tamez@uanl.edu.mx (P.T.-G.)

Abstract: *Hirsutella citriformis* Sporens is the only entomopathogenic fungus that has been applied to control the hemipteran *Diaphorina citri* Kuwayama. However, the use of available commercial products under field conditions is limited due to conidia's shelf life and short environmental persistence. We have previously reported the citrus psyllid *D. citri* adults' biocontrol potential using *H. citriformis* strains. The aim of the present study was to evaluate different formulations based on *H. citriformis* (CP-Hir-3, CP-Hir-10, and CP-Hir-12 strains) conidia and gums as additives to improve *D. citri* adults' biocontrol, under laboratory, greenhouse, and field conditions, using *Hirsutella* gums as conidia stabilizers to improve their viability under environmental drought conditions and as insecticide. Laboratory bioassay results showed that the highest ($p < 0.05$) *D. citri* mortality was achieved using POP-Hir-10GH (63.5%), followed by the *Hirsutella* gum control (42.2%). Under greenhouse conditions, adults' mortality reached up to 84.6% with POP-Hir-12 and 49.0% with *Hirsutella* gum. In addition, we applied *H. citriformis* formulations under field conditions in a commercial citrus grove located in Tecuacán, Colima, México, at 21.5 °C and 73.3% relative humidity (RH) in March and 25.7 °C and 72.5% RH in October 2022 and observed 67.3% and 94.0% mortality of *D. citri* adults, respectively. *Hirsutella* gum alone showed significant insecticidal activity against *D. citri* adults. In conclusion, this study demonstrated that *Hirsutella* gum functioned as additive to *H. citriformis* conidia formulations, improving *D. citri* adults' mortality and showing potential for this pest biocontrol in citrus orchards.

Keywords: Asian citrus psyllid; improved bioinsecticide; citrus orchards



Citation: Cantú-Bernal, S.H.; Gomez-Flores, R.; Flores-Villareal, R.A.; Orozco-Flores, A.A.; Romo-Sáenz, C.I.; Montesinos-Matías, R.; Mellín-Rosas, M.A.; Sánchez-González, J.A.; Flores-González, G.; Tamez-Guerra, P. Adult *Diaphorina citri* Biocontrol Using *Hirsutella citriformis* Strains and Gum Formulations. *Plants* 2023, 12, 3184. <https://doi.org/10.3390/plants12183184>

Academic Editor: Yun-Hong

Received: 30 August 2023

Revised: 23 August 2023

Accepted: 3 September 2023

Published: 6 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Diaphorina citri Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), known as the Asian citrus psyllid, is the most serious threat to citrus crops worldwide. It is the vector of *Candidatus Liberibacter* spp., the causal agent of the Huanglongbing disease (HLB). *D. citri* is widely distributed in citrus growing regions, including tropical and subtropical Asia, the Middle East, Central America, South America, Mexico, and Brazil [1]. There is no cure for trees infected by this citrus-devastating disease [2,3]. Mexican citrus-producing orchards comprise 56.0% oranges (*Citrus × sinensis* L.) Osbeck, 33.5% lemons (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) and 10.5% other citrus fruits, such as grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad.) and mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco) [4]. HLB was detected in the Campeche and Quintana Roo Mexican states in 2002, and it has spread to all citrus-producing country areas [5]. HLB has

Article

Increased *Hirsutella citriformis* Conidia Shelf Life in *Acacia* and *Hirsutella* Gum Formulations

Rosa A. Flores-Villareal, Alonso A. Orozco-Flores, Servando H. Cantú-Bernal , Ricardo Gomez-Flores, Orquídea Pérez-González * and Patricia Tamez-Guerra * 

Departamento de Microbiología y Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Avenida Pedro de Alba, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza 66455, Nuevo León, México; rosa.flores.villareal@uanl.edu.mx (R.A.F.-V.); alonso.oro@uanl.edu.mx (A.A.O.-F.); servando.cantu@uanl.edu.mx (S.H.C.-B.); ricardo.gomez@uanl.edu.mx (R.G.-F.);

* Correspondence: opencog@uanl.edu.mx (O.P.-G.); patricia.tamez@uanl.edu.mx (P.T.-G.);
Tel.: +1-52-8163-294000 (ext. 6453) (P.T.-G.)

Abstract: Biological control by beneficial microorganisms is known to significantly reduce the effect of pests on crops yield. Among the biocontrol strategies is the use of entomopathogenic fungi such as *Hirsutella citriformis*, which has been applied to infect and kill hemipteran insect pests, including *Diplophis citri* Kawaiama (Hemiptera: Liviidae) and *Bactericera cockerelli* Sulz. (Hemiptera: Triozidae). These biological agents are applied in the form of conidia that are often combined with other inert materials to facilitate application, protect conidia, and improve their shelf life. The aim of this study was to implement strategies for developing formulations to increase conidia shelf life. We evaluated gum produced from one strain and conidia from two different *H. citriformis* strains. Conidia were formulated by evaluating different concentrations of *Acacia* and *Hirsutella* gums to enhance conidia viability during storage at 4 °C or 25 °C. Results indicated that formulations maintained conidia viability for at least 90 d after storage at 25 °C (≥70% viability) and at least 120 d after storage at 4 °C, which was significantly ($p < 0.05$) higher than that of the control, without observing changes in pH values. We also demonstrated 100% formulation purity from days 0 to 120, among all treatments. In conclusion, evaluated formulations maintained *H. citriformis* conidia viability for at least three months, when stored at 4 °C.

Keywords: biocontrol; *Acacia* gum; *Hirsutella* gum; entomopathogenic fungi; hemipterids; shelf life; conidia formulation



Citation: Flores-Villareal, R.A.; Orozco-Flores, A.A.; Cantú-Bernal, S.H.; Gomez-Flores, R.; Tamez-Guerra, P.; Tamez-Guerra, P. Increased *Hirsutella citriformis* Conidia Shelf Life in *Acacia* and *Hirsutella* Gum Formulations. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 7912. <https://doi.org/10.3390/app13137912>

Academic Editor: Spiridon Mastromarino

Received: 30 May 2023

Revised: 27 June 2023

Accepted: 28 June 2023

Published: 6 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Chemical pesticides currently account for 95% of the global pesticide market and prevent about 50% of crop losses, which have not decreased in the last decades. Reports of the undesirable effects of chemical pesticides on animal and human health have prompted the search for alternatives to chemical pesticides [1,2].

Biological control of insect pests reduces harmful chemicals and pest-associated crop yield loss by using beneficial organisms, including insects, plants, or microorganisms. One of the most relevant biological control strategies under development are biopesticides, involving formulations based on entomopathogenic bacteria, fungi, or viruses [3,4].

Entomopathogenic fungi are commonly used as biopesticides to control aphids, ticks, and other insect plague populations, affecting plants and animals [5]. Their application is in the form of conidia, which are commonly combined with other inert materials for protection from environmental changes and stabilization during storage [6]. Some polymers used as adherents in formulations have a dual purpose. For example, arabic gum (*Acacia* gum) is used as an emulsifier for safer and effective bioactive components delivery after an application [7] and to encapsulate entomopathogenic fungi [8]. It has also been reported that *Hirsutella* produces a protective exopolysaccharide against desiccation [9,10].

Article

Improved *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) Adults Biocontrol in Citrus by *Hirsutella citrififormis* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) Gum-Enhanced Conidia Formulation

Orquídea Pérez-González ¹, Ricardo Gómez-Flóres ¹, Roberto Montestinos-Matías ^{2,3}, Marco A. Mellín-Rosas ², Servando H. Cantú-Bernal ¹ and Patricia Tamez-Guerra ^{1,*} 

¹ Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nayarit, San Nicolás de los Garza C.P. 66451, NL, México

² Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, SENASICA, Secretaría C.P. 28110, Col, México

* Correspondence: patricia.tamez@uand.edu.mx; Tel: +1-52-8163-294-000 (ext. 6453)

Abstract: *Hirsutella citrififormis* Sparre is the only entomopathogenic fungus involved in *Diaphorina citri* Kurwayama natural epizootics. The aim of the present study was to evaluate different protein sources as supplements to stimulate *Hirsutella citrififormis* growth, improve conidiation on solid culture, and evaluate its produced gum for conidia formulation against *D. citri* adults. *Hirsutella citrififormis* INIHAP-His-2 strain was grown on agar media enriched with wheat bran, wheat germ, soy, amaranth, quinoa, and pumpkin seed, in addition to oat with wheat bran and/or amaranth. The results demonstrated that 2% wheat bran significantly ($p < 0.05$) promoted mycelium growth. However, 4% and 5% wheat bran achieved the highest conidiation (3.65×10^7 conidia/mL and 3.68×10^7 conidia/mL, respectively). Higher conidiation ($p < 0.05$) was observed on oat grains supplemented with wheat bran, as compared with culturing on oat grains without supplements (7.25×10^7 versus 5.22×10^7 conidia/g), after a 34 d instead of 21 d incubation period. After supplementing synthetic medium or oat grains with wheat bran and/or amaranth, INIHAP-His-2 conidiation increased, whereas production time was reduced. After using *Acacia* and *Hirsutella* gums to formulate conidia produced on wheat bran and amaranth at 4%, field trial results showed that the highest ($p < 0.05$) *D. citri* mortality was achieved by *Hirsutella* gum-formulated conidia (80.0%), followed by the *Hirsutella* gum control (57.8%). Furthermore, *Acacia* gum-formulated conidia caused 37.8%, whereas *Acacia* gum and negative controls induced 9% mortality. In conclusion, *Hirsutella citrififormis* gum used to formulate its conidia improved biological control against *D. citri* adults.

Keywords: fungi culture; higher spore yields; solid fermentation; *Acacia* gum; gum production; conidia production



Citation: Pérez-González, O.; Gómez-Flóres, R.; Montestinos-Matías, R.; Mellín-Rosas, M.A.; Cantú-Bernal, S.H.; Tamez-Guerra, P. Improved *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) Adults Biocontrol in Citrus by *Hirsutella citrififormis* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) Gum-Enhanced Conidia Formulation. *Plants* 2023, 12, 1409. <https://doi.org/10.3390/plants12061409>

Academic Editors: Bin Li, Muhammad Shabid, Tamer A. Yousef, Mahamed Nasser and Amir Hammad

Received: 8 February 2023
Revised: 9 March 2023
Accepted: 9 March 2023
Published: 22 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The Asian citrus psyllid or *Citrus psylla* (*Diaphorina citri* Kurwayama) causes the most serious disease of citrus in Mexico and worldwide [1]. Its lifecycle ranges from 15 d to 47 d, depending on weather conditions, and adults live a few months. It produces 9 to 10 generations yearly, whose eggs hatch from 2 d to 4 d and five instars are completed within 11 d to 15 d [2]. Both nymphs and adults are sucking insects, leading to leaves curling, defoliation, flowers falling, and branch death. The resulting damage is known as dieback [1]. *Diaphorina citri* Kurwayama, a vector of *Ca. Liberibacter*, is the causal agent of Huanglongbing (HLB), which is susceptible to *Hirsutella* infection [1,3–5]. HLB is considered one of the most devastating diseases of cultivated citrus species globally, causing important economic losses [6,7]. To date, more than 60 million trees have been affected [8]. In South Africa, damages amounting to 100% of crop losses were reported, whereas in Brazil and the USA, HLB has caused significant citrus production reduction [9,10]. In Mexico, HLB infection has caused a 42% and 33% decrease in orange and lemon production,

Effect of Physical and Nutritional Conditions on Growth and Conidial Production and Virulence of *Beauveria* sp.¹ against Lepidoptera and Coleoptera Pests

Orquidea Pérez-González², Servando H. Carbi-Bernal²,
Nimbe Nayeli Carbajal-Cruz², and Victor E. Aguirre-Arzola^{3*}

Abstract. Effect of physical and nutritional conditions such as culture temperature, pH, light, and culture and substrate medium with supplements were assessed for vegetative growth and production of conidia, in addition to virulence against Lepidoptera and Coleoptera pests by strains of *Beauveria* sp. Dextrose, peptone, and yeast agar with wheat bran or amaranth flour, 23 to 25°C, 7.5-8.5 pH, and obscure light were optimum for radial growth. Light and pH for most production of conidia depended on the fungal strain. Most conidia per gram were produced with 4% amaranth added to oat grain and culture in dextrose, peptone, and yeast broth with 2% wheat bran. Both fungal strains killed 91.1-96.0% of *Phyllophaga* sp. (Coleoptera: Scarabaeidae) and *Spodoptera exigua* Hübner and *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Results confirmed the possibility of increased production of *B. bassiana* conidia by protein supplements and physical growing conditions to maintain pathogenicity.

Introduction

Insect pests that cause much economic loss in Mexico include armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner, and cabbage looper, *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), larvae that damage a variety of crops. Larvae of the May beetle, *Phyllophaga* sp. (Coleoptera: Scarabaeidae) destroy plant roots. Insecticide used for control is costly and can contaminate the environment and kill beneficial organisms. Biological control is an alternative to reduce problems caused by diverse pests (Leathers and Gupta 1993). Entomopathogenic fungus such as *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin has been extensively used for control of many important insect pests (Clarkson and Chamley 1996).

Entomopathogenic fungi can be isolated from different habitats, with soil being important for *Beauveria* (Vanninen et al. 1989, Milner 1992, Bidochka et al. 2001). However, most fungal strains for biological control of insects have been isolated from infected insects, not soil (Poprawski et al. 1999, Liu et al. 2002, Liu and Bauer 2005). Fungal strains very pathogenic against different insects is desirable, because management of several insect species often is required in agriculture. For

¹Hypocreales: Cordycepsaceae.

²Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Ave. Universidad s/n San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. C.P. 66450.

³Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Facultad de Agronomía, Francisco I. Madero s/n, Hacienda el Camalé, Col 17, Cd. Gen. Escobedo, N.L. CP 66280.

*Corresponding author: Dr. Víctor E. Aguirre-Arzola

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18, 265–267.
- Aidoo OF, Tanga CM, Mohamed SA, Khamis FM, Baleba SB, Rasowo BA, ... & Borgemeister C. 2020. Detection and monitoring of ‘*Candidatus*’ *Liberibacter* spp. vectors: African citrus triozid *Trioza erytrae* Del Guercio (Hemiptera: Triozidae) and Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) in citrus groves in East Africa. *Agricultural and Forest Entomology*, 22(4), 401-409.
- Allegrucci N, Velazquez, MS, Russo ML, Pérez ME, & Scorsetti AC. 2017. Endophytic colonisation of tomato by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: the use of different inoculation techniques and their effects on the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Plant Protection Research*, DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/jppr-2017-0045>
- Bamisile BS, Dash CK, Akutse KS, Qasim M, Ramos-Águila LC, Wang F, ... & Wang L. 2019. Endophytic *Beauveria bassiana* in foliar-treated *Citrus limon* plants acting as a growth suppressor to three successive generations of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *Insects*, 10(6), 176.
- Bamisile, BS, Senyo-Akutse K, Dash CK, Qasim M, Ramos-Águila LC, Ashraf HJ., ... & Wang L. 2020. Effects of seedling age on colonization patterns of *Citrus limon* plants by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their influence on seedlings growth. *Journal of Fungi*, 6(1), 29.
- Behie SW, Jones SJ, & Bidochka MJ. 2015. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology*, 13, 112-119.
- Berlanga-Padilla AM, Gallou A, Ayala-Zermeño MA, Serna-Domínguez MG, Montesinos-Matías R, Rodríguez-Rodríguez JC., & Arredondo-Bernal HC. 2018. Hongos entomopatógenos asociados a *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en Colima, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 89(4), 986-1001.

- Boucias DG, Scharf DW, Breaux SE, Purcell DH, & Mizell RE. 2007. Studies on the fungi associated with the glassy-winged sharpshooter *Homalodisca coagulata* with emphasis on a new species *Hirsutella homalodiscae* nom. prov. *Biocontrol*, 52, 231-258.
- Brownbridge M, Reay SD, Nelson TL, & Glare TR. 2012. Persistence of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte following inoculation of radiata pine seed and seedlings. *Biological control*, 61(3), 194-200.
- Cabrera RI, González C, Hernández D y Rodríguez JL. 2004. Presencia del hongo *Hirsutella citriformis* sobre *Diaphorina citri* Kuw. (Homoptera: Psyllidae) en los cítricos de Cuba. *Levante Agrícola* 43: 369.
- Camacho-Tapia M, Rojas-Martínez RI, Rebollar-Alviter Á, Aranda-Ocampo S, & Suárez- Espinosa J. (2016). Biological, ecological, epidemiological and management aspects of *Candidatus Liberibacter*. *Revista Chapingo serie horticultura*, 22(1), 5- 16.
- Carlson CR, Ter-Horst AM, Johnston JS, Henry E, Falk BW, & Kuo YW. 2022. High-quality, chromosome-scale genome assemblies: comparisons of three *Diaphorina citri* (Asian citrus psyllid) geographic populations. *DNA Research*, 29(4), dsac027.
- Casique-Valdes R, Reyes-Martinez AY, Sanchez-Peña SR., Bidochka MJ, & Lopez-Arroyo JI. 2011. Pathogenicity of *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Cordycipitaceae) to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Florida Entomologist*, 94(3), 703-705.
- Corallo AB, Pechi E, Bettucci L, & Tiscornia S. 2021. Biological control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) by entomopathogenic fungi and their side effects on natural enemies. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 1-9.
- da Graça JV. 2008. Biology, history and world status of Huanglongbing. *Memorias del Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos*. Hermosillo, Son. México.
- Delgado-Ortiz JC., Beltrán-Beache M, Cerna-Chávez E, Aguirre-Uribe LA, Landero-Flores J, Rodríguez-Pagaza Y, & Ochoa-Fuentes YM. 2019. *Candidatus Liberibacter solanacearum* patógeno vascular de solanáceas: Diagnóstico y

- control. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 22.
- Díaz-Padilla G, López-Arroyo JI, Sánchez-Cohen I, Guajardo-Panes RA, Mora-Aguilera G, & Quijano-Carranza JÁ. 2014. Áreas de abundancia potencial en México del vector del huanglongbing, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). Revista mexicana de ciencias agrícolas, 5(7), 1137-1153.
- Fernandes ÉK, Bittencourt VR, Roberts DW. 2012. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. Experimental parasitology, 130(3), 300-305.
- Flores-Villarreal RA, Orozco-Flores AA, Cantú-Bernal SH, Gomez-Flores R, Pérez-González O, Tamez-Guerra P. 2023. Increased *Hirsutella citriformis* conidia shelf life in Acacia and *Hirsutella* gum formulations. Applied Sciences, 13(13), 7912.
- Gandarilla-Pacheco FL, López-Arroyo JI, Galán-Wong LJ, Quintero-Zapata I. 2013. Patogenicidad de hongos entomopatógenos nativos de la zona citrícola de México sobre ninfas de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). Southwestern Entomologist, 38(2).
- Gottwald TR. 2010. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. Annual review of phytopathology, 48, 119-139.
- Haapalainen M. 2014. Biology and epidemics of *Candidatus Liberibacter* species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. Annals of applied biology, 165(2), 172-198.
- Hall DG. 2008. Biology, history and world status of *Diaphorina citri*. In *Proceedings of the International Workshop on Huanglongbing and Asian Citrus Psyllid* (Vol. 8, pp. 1-11).
- Hall DG, Hentz MG, Meyer JM, Kriss AB, Gottwald TR, Boucias DG. 2012. Observations on the entomopathogenic fungus *Hirsutella citriformis* attacking adult *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in a managed citrus grove. BioControl, 57, 663-675.
- Hall DG, Richardson ML, Ammar ED, Halbert SE. 2013. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. Entomologia Experimentalis et Applicata, 146(2), 207-223.
- Hernández-Hernández R, Granados Ramírez GR, Mora-Aguilera G, Aguirre-Gómez

- R, León-García I. 2019. Reconversión de cultivos como resultado de la presencia de Huanglongbing en Colima, México. *Acta universitaria*, 29.
- Hernández-Fuentes LM, Urias-López MA, López-Arroyo JI, Gómez-Jaimes R, Bautista- Martínez N. 2012. Control químico de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en lima persa *Citrus latifolia* Tanaka. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(3), 427-439.
- Herrero-Galán E, Lacadena J, Martínez del Pozo A, Boucias DG, Olmo N, Onaderra M, Gavilanes JG. 2008. The insecticidal protein hirsutellin A from the mite fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* is a ribotoxin. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 72(1), 217-228.
- Hoy MA, Singh R, Rogers ME. 2010. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist*, 93(1), 24-32.
- IBM, S. P. S. S. 2015. *Ibm Spss statistics version 22*. International Business Machines Corp: Boston, MA, USA.
- Kuzhuppillymyal-Prabhakarankutty L, Tamez-Guerra P, Gomez-Flores R, Rodriguez-Padilla MC, Ek-Ramos MJ. 2020. Endophytic *Beauveria bassiana* promotes drought tolerance and early flowering in corn. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36, 1-10.
- Lezama-Gutiérrez R, Molina-Ochoa J, Chávez-Flores O, Ángel-Sahagún CA, Skoda SR, Reyes-Martínez G, Foster JE. 2012. Use of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* and *Isaria fumosorosea* to control *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Persian lime under field conditions. *International Journal of Tropical Insect Science*, 32(1), 39-44.
- Lezama-Gutiérrez R, Ramírez-Mancilla A, Castrejón-Agapito H, Peralta-Manzo JJ, & Rebolledo-Domínguez O. 2014. Uso de *Metarhizium anisopliae* y *Cordyceps bassiana* (Ascomycetes) para el control de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) en limón mexicano. *Entomología Mexicana*, 1, 219-224.
- Li R, Jiang XL, & Guan HS. 2010. Optimization of mycelium biomass and exopolysaccharides production by *Hirsutella* sp. in submerged fermentation and evaluation of exopolysaccharides antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology*, 9(2).

- Liu WZ, Boucias DG, McCoy CW. 1995. Extraction and characterization of the insecticidal toxin hirsutellin A produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii*. *Experimental Mycology*, 19(4), 254-262.
- Mauchline NA, & Stannard KA. 2013. Evaluation of selected entomopathogenic fungi and bioinsecticides against *Bactericera cockerelli* (Hemiptera). *New Zealand Plant Protection*, 66, 324-332.
- Meyer JM, Hoy MA, & Boucias DG. 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(2), 101-109.
- Merfa MV, Pérez-López E, Naranjo E, Jain M, Gabriel DW, & De La Fuente L. 2019. Progress and obstacles in culturing ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, the bacterium associated with Huanglongbing. *Phytopathology*, 109(7), 1092-1101.
- Mora-Aguilera G, Robles-García P, López-Arroyo JI, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, ... & González-Gómez R. 2014. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista mexicana de fitopatología*, 32(2), 108-119.
- Pérez-González O, Gomez-Flores R, & Tamez-Guerra P. 2022. Insight into biological control potential of *Hirsutella citriformis* against Asian citrus psyllid as a vector of citrus Huanglongbing disease in America. *Journal of Fungi*, 8(6), 573
- Pérez-González O, Maldonado-Blanco MG, & Valdes-Gonzalez A. 2017. Conidial production on different solid substrates and pathogenicity of *Hirsutella citriformis*1 against *Diaphorina citri*2 adults. *Southwestern Entomologist*, 42(4), 1027-1034.
- Pérez-González O, Rodríguez-Guerra R, López-Arroyo JI, Sandoval-Coronado CF, & Maldonado-Blanco MG. 2015. Radial growth, sporulation, and virulence of Mexican isolates of *Hirsutella citriformis*1 against *Diaphorina citri*2. *Southwestern Entomologist*, 40(1), 111-120.
- Pérez-González O, Rodríguez-Guerra R, López-Arroyo JI, Sandoval-Coronado CF, & Maldonado-Blanco MG. 2016b. Effect of Mexican *Hirsutella citriformis* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) strains on *Diaphorina citri* (Hemiptera:

- Liviidae) and the predators *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae) and *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae). *Florida Entomologist*, 99(3), 509-515.
- Pérez-González O, Rodríguez-Villarreal RA, López-Arroyo JI, Maldonado-Blanco MG, & Rodríguez-Guerra R. 2015. Mexican strains of *Hirsutella* isolated from *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae): morphologic and molecular characterization. *Florida Entomologist*, 98, 290-297.
- Pérez-González O, Sandoval-Coronado CF, & Maldonado-Blanco MG. 2016a. Evaluation of Mexican strains of *Hirsutella citriformis*1 against *Diaphorina citri*2 in a semifield bioassay. *Southwestern Entomologist*, 41(2), 361-372.
- Polanco-Florián LG, Alvarado-Gómez OG, Pérez-González O, González-Garza R, & Olivares-Sáenz E. 2019. Hongos asociados con la muerte regresiva de los cítricos en Nuevo León y Tamaulipas, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(4), 757-764.
- Quintana-González de Chaves M, Teresani GR, Hernández-Suárez E, Bertolini E, Moreno A, Fereres A, Siverio F. 2020. ‘*Candidatus* Liberibacter Solanacearum’ is unlikely to be transmitted spontaneously from infected carrot plants to citrus plants by *Trioza erytreae*. *Insects*, 11(8), 514.
- Ramachandran A, Thangappan BS, & Ponnusamy P. 2013. Evaluation of secondary metabolites of *Hirsutella citriformis* against *Udaspes folus* infecting *Curcuma longa* L. *Journal of Pharmacy Research*, 7(1), 7-14.
- Reddy N, Mahesh G, Priya M, Singh RS, & Manjunatha L. 2020. *Hirsutella*. In *Beneficial microbes in agro-ecology* (pp. 817-831). Academic Press.
- Rivero A, & Grillo R. 2000. Natural enemies of *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) in the central region of Cuba. *Centro Agrícola*, 27(3), 87- 88.
- Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MÁ, Orozco-Santos M, Medina-Urrutia VM, López-Arroyo J., & Flores-Virgen R. 2013. Síntomas del Huanglongbing (HLB) en árboles de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] y su dispersión en el estado de Colima, México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 19(1), 15-31.

- Ruiz-Galván I, Bautista-Martínez N, Sánchez-Arroyo H, & Valenzuela-Escoboza FA. 2015. Control químico de *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae) en lima persa. *Acta zoológica mexicana*, 31(1), 41-47.
- Sarkar P, & Ghanim M. 2020. Unravelling the pathogenesis and molecular interactions of *Liberibacter* phytopathogens with their psyllid vectors. *Agronomy*, 10(8), 1132.
- Saldarriaga-Ausique JJ, D'Alessandro CP, Conceschi MR, Mascarín GM, & Delalibera Júnior I. 2017. Efficacy of entomopathogenic fungi against adult *Diaphorina citri* from laboratory to field applications. *Journal of Pest Science*, 90, 947-9
- Samson RA. 1974. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Studies in mycology*, 6, 1-119.
- SENASICA 20 Años del psílido asiático de los cítricos en México ¿Hay algo que celebrar? Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)—Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). México. 2022.
- SENASICA. 2019. Psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-Dirección General de Sanidad Vegetal-Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Ciudad de México. Ficha Técnica 77. 16 pp.
- Sharma A, Sharma S, & Yadav PK. 2023. Entomopathogenic fungi and their relevance in sustainable agriculture: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 9(1), 2180857.
- Simmons DR, Kepler RM, Renner SA, & Groden E. 2015. Phylogeny of *Hirsutella* species (Ophiocordycipitaceae) from the USA: remedying the paucity of *Hirsutella* sequence data. *IMA fungus*, 6(2), 345-356.
- SPSS 22 for Windows. 2013. Statistical Package for the Social Sciences. IBM-SPSS Inc.
- Subandiyah S, Nikoh N, Sato H, Wagiman F, Tsuyumu S, & Fukatsu T. 2000. Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera, Psylloidea) in Indonesia. *Mycoscience*, 41(5), 509-513.

- Tsai JH, & Liu YH. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. *Journal of Economic Entomology*, 93(6), 1721-1725.
- Ullah MI, Arshad M, Abdullah A, Khalid S, Iftikhar Y, & Zahid SMA. 2018. Use of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) and *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) to control *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) under laboratory and semi-field conditions. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28, 1-5.
- Walsh, J. L., Laurence, M. H., Liew, E. C., Sangalang, A. E., Burgess, L. W., Summerell, B. A., & Petrovic, T. 2010. *Fusarium*: two endophytic novel species from tropical grasses of northern Australia. *Fungal Diversity*, 44, 149-159. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0035-3>
- Xie PH, Su C, & Lin ZG. 1988. A preliminary study on an entomogenous fungus [*Verticillium lecanii*] of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hom.: Psyllidae). *Chinese Journal of Biological Control*, 4(2), 92.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Servando Horacio Cantú Bernal

Candidato para el grado de:

Doctor en Ciencias con orientación en

Microbiología

Tesis:

**ESTRATEGIAS PARA EL BIOCONTROL DE *Diaphorina citri* KUWAYAMA
(HEMIPTERA:LIVIIDAE) CON *Hirsutella citriformis* SPEARE**

Campo de estudio: Microbiología

Biografía:

Datos personales: Nacido en Ciudad Obregón, Sonora, el 11 de noviembre de 1988, hijo de Yanet Bernal Rojo y Hervey Cantú Beltrán.

Educación: Egresado de la Universidad de Sonora, grado obtenido: Licenciado Químico Biólogo Clínico 2013.