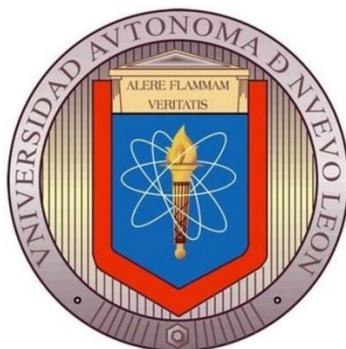


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS:

Aislamiento, producción y evaluación de la patogenicidad de cepas de *Hirsutella citriformis* Speare para el control de *Diaphorina citri* Kuwayama, vector de la enfermedad Huanglongbing de los cítricos.

Por

M. en C. ORQUÍDEA PÉREZ GONZÁLEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

San Nicolás de los Garza, N.L., México, Febrero, 2015

Aislamiento, producción y evaluación de la patogenicidad de cepas de *Hirsutella citriformis* Speare para el control de *Diaphorina citri* Kuwayama, vector de la enfermedad Huanglongbing de los cítricos.

Comité de Tesis:

Dra. María Guadalupe Maldonado Blanco
Presidente

Dr. Carlos F. Sandoval Coronado
Secretario

Dra. Myriam Elías Santos
Vocal

Dra. Ma. del Socorro Flores González
Vocal

Dr. Hugo A. Luna Olvera
Vocal

Aislamiento, producción y evaluación de la patogenicidad de cepas de *Hirsutella citriformis* Speare para el control de *Diaphorina citri* Kuwayama, vector de la enfermedad Huanglongbing de los cítricos.

Comité de Tesis

Dra. María Guadalupe Maldonado Blanco
Director

Dr. Raúl Rodríguez Guerra
Director externo

Dr. J. Isabel López Arroyo
Asesor externo

DEDICATORIA

A mi compañero de vida el cual siempre me ha apoyado para que siga superándome. A mi hijo Edgar Arturo el cual ha tenido que soportar el ser desatendido por mis estudios y a todos los miembros de mi familia.

Gracias por su apoyo ahora y siempre.

“El mayor error que una persona puede cometer es tener miedo de cometer un error.” (Elbert Hubbard)

“La pasión es la energía que nos impulsa a superar los obstáculos y la fuerza que nos permite convertir nuestros sueños en realidad”. (Cynthia Kersey)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por haberme brindado la oportunidad de continuar preparándome en el programa de posgrado.

A la Dra. María Guadalupe Maldonado Blanco, Dr. Carlos Francisco Sandoval Coronado, Dra. Myriam Elías Santos, Dr. Raúl Rodríguez Guerra y al Dr. José Isabel López Arroyo por sus aportaciones y tiempo dedicado durante este trabajo de tesis.

Al Dr. Hugo Alberto Luna Olvera, Dra. María del Socorro Flores González por su tiempo y comentarios realizados que ayudaron a enriquecer este trabajo.

Al Dr. Arcadio Valdez el cual me animó a ingresar al programa de posgrado y me apoyó durante todo la investigación.

A la Dra. Lilia H. Morales Ramos por su apoyo durante esta investigación.

A la M en C. Reyna Ivonne Torres Acosta por su apoyo incondicional en la realización de los diferentes bioensayos.

A todas las personas del Instituto de Biotecnología (UANL) que directa o indirectamente me ayudaron en la realización del presente trabajo de tesis.

A todas las personas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) que directa o indirectamente me ayudaron en la realización del presente trabajo de tesis.

A todas las personas que me apoyaron durante todo el tiempo que estuve en el Instituto Compañeros y maestros, gracias por todo.

INDICE

INDICE DE TABLAS	IX
INDICE DE FIGURAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	7
Generalidades	7
Distribución geográfica del HLB	7
Impacto económico del HLB En México	9
Agente causal	9
Síntomas	10
Trasmisión	11
Vector de la enfermedad	12
Control del vector	13
Clasificación taxonómica del género <i>Hirsutella</i>	15
Origen y distribución geográfica	16
Insectos asociados a <i>Hirsutella citrifomis</i>	19
Hongos entomopatógenos reportados sobre <i>Diaphorina citri</i>	22
Epizootias de <i>Hirsutella citrifomis</i> sobre <i>Diaphorina citri</i>	22
Actividad biológica	23
Producción a nivel laboratorio	24
Producción, formulación, aplicación y mercadeo	25
Ventajas y desventajas del uso de hongos entomopatógenos	27
JUSTIFICACIÓN	28
OBJETIVOS	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30
1.- Aislamiento de los hongos	30
2.- Mantenimiento de las cepas	30
3.- Caracterización morfométrica de <i>Hirsutella</i>	31

4.- Cultivo en medios comerciales de agar	31
4.1 Efecto de la temperatura en el crecimiento radial	31
4.2 Evaluación del crecimiento radial en 11 diferentes medios comerciales de agar	31
4.3 Evaluación de la producción de conidios	32
4.4 Análisis estadístico	32
5.- Cultivo en medios líquidos	32
5.1 Análisis estadístico	33
6.- Cultivo en sustrato vegetal	33
6.1 Medio	33
6.2 Inóculo	33
6.3 Análisis estadístico	34
7.- Caracterización de los exudados	34
7.1 Método de Bradford	34
7.2 Método del Fenol Sulfúrico	34
8.- Caracterización molecular	35
9.- Bioensayos de laboratorio con adultos y ninfas de <i>Diaphorina citri</i>	37
9.1 Obtención de ninfas y adultos de <i>Diaphorina citri</i> e insectos depredadores	37
9.2 Procedimiento de los bioensayos	38
9.2.1 Bioensayo de conidias aplicados por contacto.	38
9.2.2 Bioensayo de conidias aplicadas por asperjado en adultos.	39
9.2.3 Bioensayo de conidias aplicadas por inmersión en ninfas.	39
9.2.4 Bioensayo de blastosporas aplicadas por asperjado.	40
9.2.5 Bioensayo de conidias aplicadas por espolvoreo.	40
9.3 Registro de la mortalidad de insectos.	41
9.4 Bioensayo para determinación de la concentración letal media (CL ₅₀)	41
10.- Bioensayo con dos depredadores de <i>Diaphorina citri</i> .	42
10.- Bioensayo de campo	42
10.1 Análisis estadístico	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47

1.- Aislamientos	47
3.- Identificación morfológica de <i>Hirsutella</i>	48
4.- Cultivo en medios comerciales de agar	49
4.1 Efecto de la temperatura en el crecimiento radial	54
4.2 Evaluación del crecimiento radial en 11 diferentes medios comerciales de agar	55
4.3 Evaluación de la producción de conidios	58
5.- Cultivo en medios líquidos	58
6.- Cultivo en sustrato vegetal	62
7.- Caracterización de los exudados	63
7.1 Proteínas	63
7.2 Exopolisacáridos	64
8.- Caracterización molecular	65
9.- Bioensayos	71
9.1 Bioensayos por contacto	71
9.2 Bioensayo contra adultos de <i>D. citri</i> con asperjado de blastosporas.	77
9.3 Bioensayo de formulados con diferentes sustancias contra adultos de <i>Diaphorina citri</i> .	78
9.4 Bioensayo contra adultos de <i>D. citri</i> con asperjado de conidios.	79
9.5 Bioensayo de conidios contra ninfas de <i>D. citri</i> .	80
9.6 Bioensayo contra el depredador <i>Hippodamia convergens</i>	81
9.7 Bioensayo contra el depredador <i>Chrysoperla rufilabris</i>	82
9.8 Bioensayo para determinar la concentración letal media	83
10.- Bioensayo de campo	84
10.1 Muestreo de <i>D. citri</i> para evaluar presencia y dispersión de las cepas aplicadas.	87
CONCLUSIONES	93
RECOMENDACIONES	95
ANEXO	96
LITERATURA CITADA	99
RESUMEN BIBLIOGRÁFICO	110

INDICE DE TABLAS

Tabla		Pag.
1.-	Distribución geográfica de <i>Hirsutella citriformis</i> en el mundo	17
2.-	Estados de la República Mexicana en los cuales se reporta a <i>Hirsutella citriformis</i>	18
3.-	Hospederos de los cuales se ha aislado a <i>Hirsutella citriformis</i>	20
4.-	Origen de las cepas monoconidiales de <i>Hirsutella</i> obtenidas de ocho estados de la República Mexicana	47
5.-	Caracterización morfológica de las cepas de <i>Hirsutella citriformis</i> Speare.	48
6.-	Dimensión (μm) de estructuras de cepas de <i>Hirsutella</i> aisladas de <i>D. citri</i> en México y su comparación con otros autores	50
7.-	Caracterización de la morfología macroscópica colonial de aislados de <i>Hirsutella citriformis</i>	52
8.-	Crecimiento radial de <i>Hirsutella citriformis</i> a cuatro diferentes temperaturas y tres diferentes medios comerciales de cultivo	55
9.-	Crecimiento radial de <i>Hirsutella citriformis</i> en medios comerciales de cultivo incubados a 25 °C durante 34 días	56
10.-	Número promedio de conidios formados por <i>Hirsutella citriformis</i> en 11 diferentes medios de cultivo a 34 días de incubación	59
11.-	Blastosporas/mL producidas por ocho cepas de <i>Hirsutella citriformis</i> en casaminoácidos (Cc) y caldo papa dextrosa (PDB) incubadas a 25 °C a 250 rpm durante 14 días	60
12.-	Curva de calibración para detección de proteínas	63
13.-	Identificación de proteínas en los exudados producidos por las cepas de <i>H. citriformis</i>	63
14.-	Curva de calibración para detección de carbohidratos	64
15.-	Detección de carbohidratos en las ocho cepas de <i>H. citriformis</i>	64
16.-	Accesiones de especies de <i>Hirsutella</i> enlistadas en el NCBI al 31/Oct/2012 y usadas para establecer su relación con cepas mexicanas de <i>Hirsutella</i> aisladas de <i>Diaphorina citri</i>	65

17.-	CL ₅₀ y CL ₉₀ de conidios de la cepa INIFAP-Hir-1 de <i>Hirsutella citriformis</i> aplicadas en adultos de <i>Diaphorina citri</i>	84
18.-	Población general de <i>Diaphorina citri</i> (adultos vivos y micosados) en los árboles muestreados	85
19.-	Mortalidad media causada por cuatro cepas de <i>Hirsutella citriformis</i> contra adultos de <i>Diaphorina citri</i> y % de micosis presentada	86
20.-	Puntos muestreados cercanos al punto de aplicación, para evaluar la dispersión de las cepas de <i>Hirsutella citriformis</i> aplicadas en el bioensayo de campo	88
21.-	Reaislamiento de las cepas aplicadas y evaluadas en insectos micosados recuperados de la zona de aplicación	89

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pag.
1. Distribución Mundial del HLB.	8
2. Distribución del HLB en México.	8
3. Síntomas del HLB: amarillamiento de los brotes, moteado de hojas, frutos deformes, caída de hojas y frutos.	10
4. Adultos de los vectores <i>Diaphorina citri</i> y <i>Trioza erythrae</i> .	11
5. A y B: instares ninfales, C: adulto de <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama.	13
6. <i>Hirsutella citriformis</i> : (a) conidias, (b) fiálides típicas, (c) sinemas.	16
7. Estados de la República Mexicana de los cuales se ha aislado a <i>Hirsutella citriformis</i> .	19
8. Cepas utilizadas en los bioensayos de laboratorio.	37
9. De izquierda a derecha, arena experimental, insectos dormidos con cloroformo, inoculación por contacto, insectos en arena experimental, insectos muertos y/o micosados.	41
10. Distribución de los árboles muestreados en el huerto (los números corresponden a la ubicación de los árboles muestreados).	44
11. Metodología del bioensayo de campo.	44
12. Puntos de muestreo para determinar la dispersión de las cepas de <i>Hirsutella citriformis</i> evaluadas.	46
13. Características morfológicas de <i>Hirsutella citriformis</i> . (A) Longitud de la fiálide, (B) Anchura del conidio, (C) Longitud del conidio, (D) Anchura del conidio con envoltura mucilaginosa y (E) Longitud del conidio con la envoltura mucilaginosa.	49
14.- Características de crecimiento colonial de <i>H. citriformis</i> . Afelpado escaso (1), afelpado regular (2), afelpado abundante (3), aplanado escaso (4), aplanado regular (5), aplanado abundante (6), aplanado escaso (7), aplanado a afelpado regular (8) y aplanado a afelpado abundante (9).	51
15. Crecimiento de <i>Hirsutella citriformis</i> en tres medios de cultivo e	57

	incubadas a cuatro diferentes temperaturas.	
16.	Producción de blastosporas de <i>Hirsutella citriformis</i> en los medios de Casaminoácidos (Cc) y caldo papa dextrosa (PDB), a 250 rpm y 25 °C de incubación.	61
17.	Producción de conidias de <i>Hirsutella citriformis</i> en el sustrato vegetal, arroz.	62
18.	Exudados producidos por las cepas mexicanas de <i>Hirsutella citriformis</i> cultivadas en agar.	64
19.	Filograma realizado con secuencias de ITS 1- 5.8S- ITS 2 de 19 especies de <i>Hirsutella</i> enlistadas en el NCBI y siete cepas mexicanas de este género aisladas de <i>Diaphorina citri</i> de México.	68
20.-	Filograma realizado con secuencias del gen 28S ribosomal de 14 especies de <i>Hirsutella</i> enlistadas en el NCBI y siete cepas Mexicanas de este género aisladas de <i>D. citri</i> en México.	69
21.	Porcentaje de mortalidad de adultos de <i>Diaphorina citri</i> causada por dos cepas de <i>Hirsutella citriformis</i> en pruebas de laboratorio.	72
22.	Porcentaje de mortalidad causada por seis cepas de <i>Hirsutella citriformis</i> contra adultos de <i>Diaphorina citri</i> .	73
23.	Porcentaje de mortalidad promedio causada por nueve cepas de <i>Hirsutella citriformis</i> contra adultos de <i>Diaphorina citri</i> .	74
24.	Porcentaje de mortalidad promedio causada por cuatro cepas de <i>Hirsutella citriformis</i> contra adultos de <i>Diaphorina citri</i> .	75
25.	Porcentaje de mortalidad promedio causada por ocho cepas de <i>Hirsutella citriformis</i> contra adultos de <i>Diaphorina citri</i> .	76
26.	Porcentaje de mortalidad promedio causada por blastosporas de nueve cepas de <i>Hirsutella citriformis</i> en adultos de <i>Diaphorina citri</i> en bioensayo de laboratorio.	78
27.	Porcentaje de mortalidad promedio causada por formulados de conidias de <i>Hirsutella citriformis</i> con diferentes sustancias contra adultos de <i>Diaphorina citri</i> en bioensayo de laboratorio	79
28.	Porcentaje de mortalidad promedio causada por conidias asperjados	80

	de dos cepas de <i>Hirsutella citriformis</i> contra adultos de <i>Diaphorina citri</i> en bioensayo de laboratorio.	
29.	Porcentaje de mortalidad promedio causada por conidias de ocho cepas de <i>Hirsutella citriformis</i> contra ninfas de <i>Diaphorina citri</i> en bioensayo de laboratorio.	81
30.	Porcentaje de mortalidad promedio causada por conidias de cuatro cepas de <i>Hirsutella citriformis</i> en adultos de <i>Hippodamia convergens</i> en bioensayo de laboratorio.	82
31.	Porcentaje de mortalidad causada por conidias de cuatro cepas de <i>Hirsutella citriformis</i> en <i>Chrysoperla rufilabris</i> en bioensayo de laboratorio.	83
32.	Porcentaje de mortalidad promedio causada por conidias de cuatro cepas de <i>Hirsutella citriformis</i> en adultos de <i>Diaphorina citri</i> en bioensayo de campo.	86
33.	Cepas de <i>Hirsutellas</i> aisladas de los puntos de muestreo e identificadas en base a sus características morfológicas de crecimiento colonial.	90

LISTA DE ABREVIATURAS

Ca.	<i>Candidatus</i>
HR	humedad relativa
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
msnm	metros sobre el nivel del mar
nm	nanómetros
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pmol	pico moles
OASV	Organismos Auxiliares de Sanidad Vegetal
rpm	revoluciones por minuto
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria

RESUMEN

La industria citrícola es una de las más importantes industrias con las que cuenta el país y en los últimos años se encuentra amenazada por una plaga que está ocasionando estragos en todas las áreas citrícolas en México, el Huanglongbing o greening la cual es transmitida por el psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama, insecto que ocasiona daño en las plantas al alimentarse de los brotes tiernos y que además es el vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* para la cual no hay cura y por lo que es necesario controlar al insecto que la transmite. Por lo que el presente trabajo consistió en aislar hongos de *D. citri* micosados, identificarlos en base a sus características morfométricas y usando técnicas moleculares, cultivarlos en diferentes medios de cultivo comerciales de agar para seleccionar aquel en el cual crecen y conidian mejor, se determinó también el tipo de exudados producidos por *Hirsutella citriformis* en los medios de agar, se cultivaron en dos diferentes medios de cultivo líquido y un sustrato vegetal para obtener mayor cantidad de conidios; también se realizaron bioensayos de laboratorio para determinar la virulencia de las cepas y seleccionar aquellas que pudieran controlar mejor al insecto; se evaluó la patogenicidad que pudieran presentar sobre insectos depredadores de *D. citri*, y con los resultados obtenidos se seleccionó las cepas que presentaron mayor patogenicidad sobre el insecto vector del HLB para evaluar su actividad sobre el mismo en bioensayo de campo. Se aislaron cinco cepas de insectos micosados provenientes de diferentes regiones citrícolas, se trabajó con ellos además de tres cepas con las cuales ya contaba el INIFAP de General Terán de Nuevo León. Se identificaron morfométrica y molecularmente como *Hirsutella citriformis* Speare. Los medio comerciales de cultivo en los cuales crecen y presentan mejor conidiación son los medios agar papa dextrosa enriquecidos con extracto de levadura al 0.5 y 1 % en los cuales se obtuvo un crecimiento radial de 3.2 a 3.8 cm para las cepas IB-Hir-2 e INIFAP-Hir-1 respectivamente, a los 34 días de cultivo a 25 ± 1 °C. La conidiación obtenida para las ocho cepas no correspondió al crecimiento radial, pero si concordó en presentarse en los medios enriquecidos con extracto de levadura, los valores variaron desde 1.22×10^6 a 2.79×10^7 para las cepas

INIFAP-Hir-2 en agar papa dextrosa e IB-Hir-2 en agar papa dextrosa con extracto de levadura al 1% respectivamente. En medios líquidos la mayor producción de blastosporas obtenida fue 4.3×10^8 blastosporas /ml a los 9 días en el medio de casaminoácidos para la cepa INIFAP-Hir-1, y en caldo papa dextrosa la mayor producción la presentó a los 11 días la cepa IB-Hir-2 (7.7×10^7 blastosporas/ml). La mayor producción de conidios en el sustrato vegetal (arroz) se obtuvo a los 14 días por la cepa INIFAP-Hir-4 (1.97×10^7 conidios/gr). Se analizaron los dos tipos de exudados observados en las cepas usando los métodos de Bradford para proteínas y el del Fenol Sulfúrico para carbohidratos y con estos métodos se determinó que todas las cepas producen ambos tipos de compuestos, además de que las proteínas son los exudados amarillo claro y oscuro, mientras que los carbohidratos corresponden a las gotas cristalinas producidas por las cepas en los diferentes medios de agar. En los diferentes bioensayos de laboratorio las cepas presentaron mayor mortalidad cuando se inoculó por contacto, donde las cepas INIFAP-Hir-1, INIFAP-Hir-2, IB-Hir-1 e IB-Hir-2 mostraron los mayores porcentajes de mortalidad media. Al evaluar la patogenicidad de cuatro cepas sobre dos depredadores de *D. citri*, los resultados fueron similares para tratamientos y testigo y no se presentó micosamamiento en los insectos muertos. Bajo condiciones de laboratorio la CL_{50} y CL_{90} obtenidas para el aislado INIFAP-Hir-1 fueron, 34×10^5 y 26.7×10^7 respectivamente. En el bioensayo de campo se usaron las cepas INIFAP.Hir-2, INIFAP.Hir-4, IB-Hir-1 e IB-Hir-2 y el mayor porcentaje de mortalidad obtenida fue 51.049 y el menor 35.7 para las cepas INIFAP-Hir-4 e IB-Hir-1 respectivamente, mientras que el testigo con adherente mostro 6.059 y en el testigo absoluto 4.84 % de mortalidad promedio. Además logramos aislar la cepa que los micosaba de 20 insectos colectados en diferentes puntos de muestreo, identificando en base a sus características morfológicas de crecimiento colonial a tres de las cepas evaluadas y a la cepa nativa de Martínez de la Torre.

ABSTRACT

The citrus industry is one of the most important industries on which it counts the country and in the last years is being threatened by a plague that is causing havoc in all citrus areas in Mexico, Huanglongbing or greening which is transmitted by the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, insect that damages plants by feeding on tender shoots and it is also the vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* for which there is no cure and which is necessary to control the vector insect. Whereby the present study was to isolate fungi from mycosed *D. citri*, identify them based on their morphometric characteristics and using molecular techniques, cultivate them in different commercial culture agar media to select that in which they grow and conidiate better, the type of exudate produced by *Hirsutella citriformis* agar in agar media It was also determined, they were cultivated in two different liquid culture media and a vegetable substrate to obtain greater amount of conidia; laboratory bioassays were also performed to determine the virulence of the strains and select those that could be better control of the insect; pathogenicity that could present over insect predators of *D. citri* was evaluated, and which the results obtained, the strains which showed higher pathogenicity on vector insect of HLB were selected to evaluate their activity against *D. citri* in a field bioassay. It was isolated five strains of mycosed insects from different citrus states of Campeche, Chiapas, Colima Veracruz, and Yucatán. Mexico, it worked with them in three strains which already had the INIFAP of General Teran Nuevo Leon. They were morphometrically and molecularly identified like *Hirsutella citriformis* Speare. Commercial culture medium where they grow and exhibit better conidiation are potato dextrose agar media enriched with yeast extract (0.5 and 1%) in which a radial growth from 3.2 to 3.8 cm was obtained by IB-Hir-2 and INIFAP-Hir-1 strains, respectively, at 34 days of culture at 25 ± 1 ° C. Conidiation obtained for the eight strains did not correspond to radial growth, but agreed to appear in the media enriched with yeast extract, values ranged from 1.22×10^6 to 2.79×10^7 for strains INIFAP-Hir-2 on potato dextrose agar and IB-Hir-2 on potato dextrose agar with yeast extract 1%, respectively. In liquid media the higher production of blastospores obtained was $4.3 \times$

10^8 blastospores/ml after 9 days in medium of casaminoacids for INIFAP-Hir-1 strain, and in potato dextrose broth higher production was presented at 11 days by IB-Hir-2 strain (7.7×10^7 blastospores/ml). The higher production of conidia in vegetable substrate (rice) was obtained at 14 days by INIFAP-Hir-4 strain (1.97×10^7 conidia/g). The two kinds of exudates observed in strains were analyzed using the methods Bradford for protein and Phenol Sulfuric for carbohydrate, and with these methods, it was determined that all strains produce both types of compounds, in addition to proteins are light and dark yellow exudates, while carbohydrates correspond to crystal droplets produced by strains in different agar media. In different lab bioassays, all the isolates showed higher mortality when was inoculated by contact, where isolates INIFAP-Hir-1, INIFAP-Hir-2, IB-Hir-1 and IB-Hir-2 showed the highest percentages of mean mortality. When evaluating the pathogenicity of four strains against two predators of *D. citri*, the results obtained were similar for treatment and untreated control and any dead insects were mycosed. Under lab conditions, the LC^{50} and LC^{90} obtained for INIFAP-Hir-1 isolated were 34×10^5 and 26.7×10^7 respectively. In the field bioassay, INIFAP.Hir-2, INIFAP.Hir-4, IB-Hir-1 and IB-Hir-2 isolates were used and the highest percentage of mortality was 51,049 and the lowest 35.7 obtained by the INIFAP-Hir-4 and IB-Hir-1 respectively, while the control with adherent showed 6.059 and the absolute control 4.84% of mean mortality. Also we can be isolate the strain that mycosed of 20 insects collected in different sampling points, identified based on their characteristics morphological colony growth at three of the strains evaluated and the native strain of Martínez de la Torre.

INTRODUCCIÓN

La citricultura es una actividad agrícola altamente rentable a nivel mundial, más de 107 millones de toneladas se producen al año; entre los principales países productores se encuentran Brasil, Estados Unidos de América, China, México y España. México ocupa el cuarto lugar en producción mundial de naranjas y el segundo en producción de limas y limones con alrededor de 539,957 hectáreas de cultivo y una producción de 7, 394,917 toneladas, con un valor estimado de 8,050 millones de pesos.

En México la industria cítrica se encuentra amenazada por plagas y enfermedades ya establecidas en las huertas como la leprosis, el virus de la tristeza de los cítricos (razas débiles), la mosca blanca de la fruta, mosca mexicana de la fruta y otras que se localizan en países vecinos al nuestro como el cancro, clorosis variegada, mosca del mediterráneo, muerte súbita y virus de la tristeza de los cítricos (razas severas) y, en los últimos años por el huanglongbing.

El huanglongbing (citrus greening) conocido como HLB es una enfermedad causada por la bacteria *Candidatus liberibacter* que es un bacilo Gram negativo (G -), vascular limitado al floema, que no es posible cultivarlo en medios artificiales. Esta enfermedad es transmitida principalmente por los insectos vectores *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) y *Trioza erytrae* (Hemiptera: Triozidae), aunque también es posible esparcirla por injertos de yemas infectadas y movimiento de un lugar a otro de plantas enfermas. De los insectos vectores, *Diaphorina citri* por sus características de crecimiento es el principal vector de la enfermedad en México. Este insecto se caracteriza por tener un período corto de vida y fecundidad alta ya que llega a ovipositar hasta 800 huevecillos y tener además mayor resistencia al clima de nuestro país.

El HLB está considerada como una de las enfermedades más destructivas en los cítricos a nivel mundial ya que afecta a todo tipo de cítricos ocasionando hasta la muerte de la planta, se distribuye rápidamente, y además no existe cura para la misma por lo que lo único posible y recomendable por hacer es cortar y quemar las plantas infectadas para

evitar que sirvan de reservorio y de ahí se esparza a otros árboles. Actualmente se trabaja en el control del vector de la enfermedad usando para ello diferentes insecticidas químicos, aplicación del control biológico con el uso de depredadores y parasitoides del vector, así como también se está estudiando el uso de diferentes hongos entomopatógenos.

En México se han evaluado a diversos hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae* e *Hirsutella citriformis* contra *D. citri* en bioensayos de laboratorio; pero es importante tomar en cuenta que solo a *Hirsutella citriformis* se le ha encontrado causando epizootias naturales sobre *D. citri*, lo cual lo hace uno de los hongos más viables para ser usado en el control del psílido.

Para realizar un buen control del vector, lo más recomendable es aislar al hongo que lo parasita de las mismas regiones en las cuales se vaya a utilizar, esto con el fin de evitar el introducir microorganismos comerciales o aislados de otros lugares los cuales pueden afectar a los sistemas naturales o bien ser menos efectivos en donde sean utilizados. La presencia de *Hirsutella* fue reportada micosando a *D. citri* en diversas áreas citrícolas del país desde el 2008 (López-Arroyo et al. 2008), y fue aislado de insectos micosados colectados en el Estado de Tabasco en ese mismo año.

Por todo lo anterior, se aisló al hongo *Hirsutella citriformis* de insectos vectores proporcionados de algunas de las zonas citrícolas de nuestro país, se les identificó morfológica y molecularmente; se cultivaron en diferentes medios y sustratos (económicos) para determinar el mejor para la producción de conidios y que el cultivo masivo de ellos sea factible para su uso en el control biológico del vector y finalmente se evaluaron las distintas cepas para seleccionar aquel o aquellos que presentaran mayor patogenicidad.

ANTECEDENTES

Generalidades.

El Huanglongbing (amarillamiento o dragón verde de los cítricos) es una palabra de origen chino que significa enfermedad del brote amarillo, se le reportó por primera vez en China a fines del siglo XIX (Zhao 1981). Se reconocen dos distintos tipos de la enfermedad; el tipo asiático (Capoor *et al.* 1967) y el tipo africano (Jagoueix *et al.* 1996) que es menos severo. Hasta el año 2004, América se encontraba libre del HLB, los primeros reportes se registran en Marzo del 2004 y Agosto del 2005 cuando los síntomas de la enfermedad son descubiertos en Sao Paulo, Brasil y Florida Estados Unidos respectivamente (Bove 2006). Esta es una enfermedad de reciente introducción en México ya que es reportada por primera vez en julio del 2009, (SENASICA 2009, 2010, www.senasica.gob.mx), atacando a todo tipo de cítricos y a la limonaria *Murraya paniculata*.

Distribución geográfica del HLB

El HLB se encuentra ampliamente distribuido en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* se reportó por primera vez en China a fines del siglo XIX (Zhao 1981), posteriormente se encontró en Taiwan y las islas Filipinas (Otake 1990), y para fines del año 1990 se detecta una nueva variante de la bacteria (var. Africanus) en Sudáfrica (Van Der Merwe y Andersen 1937). En el 2004 se reportó la presencia de *Ca. Liberibacter asiaticus* en Sao Paulo, Brasil (Coleta-Filho *et al.* 2004), posteriormente se descubrió una nueva especie de la bacteria *Ca. Liberibacter* en cítricos a la cual se llamó *Ca. Liberibacter americanus* (Teixeira *et al.* 2005), un año después en el 2005 se reporta la presencia de *Ca. Liberibacter asiaticus* en Florida (Halbert 2005; Bouffard 2006), se reconoce la presencia de la enfermedad en cerca de 40 países de Asia, Africa, Oceanía y América (Figura 1). En México se reportó por primera vez a la bacteria *Ca. Liberibacter asiaticus* en julio del 2009 en la localidad el Cuyo del municipio de Tizimin, Yucatán (SENASICA 2009, 2010, www.senasica.gob.mx), de ahí en el mismo año se extiende a Nayarit y Jalisco y a la fecha se encuentra

presente en 12 estados (Figura 2) productores de cítricos de la República Mexicana (SENASICA 2013, www.senasica.gob.mx).



Figura 1. Distribución Mundial del HLB.



Figura 2. Distribución del HLB en México

Impacto económico del HLB en México

La citricultura en México es considerada una de las más importantes industrias agrícolas, y a nivel mundial México está catalogado como el cuarto país productor de cítricos, (SIAP 2008, www.siap.gob.mx; FAO 2010, www.fao.org.mx/), con un valor estimado de producción cercano a los nueve mil millones de pesos. La mayoría de la producción es naranja tipo valencia. Por la naturaleza agresiva del patógeno, la mayoría de los árboles infectados mueren en un plazo de 3 a 10 años y no existe cura para la enfermedad. Por lo cual, los efectos negativos del HLB comprenden la reducción de la producción citrícola nacional, reducción de las fuentes de empleo en campo, agroindustria y actividades afines (hasta 90,000 empleos), disminución de los productos derivados de los cítricos, subutilización de la capacidad agro-industrial establecida (hasta un 71%), disminución de ingresos por exportación de cítricos y derivados (ca. 1880 millones de pesos) y disminución de ingresos a nivel nacional (hasta 6,985 millones de pesos).

Agente causal

El HLB es causado por tres especies de α -Proteobacterias, Gram negativas, exclusivas del floema, pertenecientes al género *Candidatus* (*Ca.*) *Liberibacter* (L.) como son *Ca. L. africanus*, sensible al calor (20-25 °C) y restringida a África (Bové 2006); *Ca. L. asiaticus*, tolerante al calor ($\leq 35^{\circ}\text{C}$) y ampliamente distribuida a nivel mundial (Asia, Oceanía y América) (Miyakawa y Tsuno 1989; Texeira *et al.* 2005; Bové 2006) y *Ca. L. americanus*, sensible al calor ($\leq 32^{\circ}\text{C}$) y presente sólo en Brasil (Texeira *et al.* 2005a). La cepa africana produce síntomas menos severos a temperatura frescas (22 a 24°C), normalmente encontradas en altas elevaciones (900 m.s.n.m.). La cepa asiática produce síntomas severos tanto en temperaturas frescas como calurosas (27 a 32°C), encontradas en bajas elevaciones (360 m.s.n.m.). El agente causal que afecta a la citricultura brasileña es una variante de *Ca. Liberibacter asiaticus* a la cual se le ha denominado *Ca. Liberibacter americanus*.

Síntomas

Los síntomas varían de acuerdo al tiempo de infección (Figura 3), variedad, especie y madurez del árbol, ya que estos se observan claramente en árboles jóvenes y vigorosos, mientras que en los afectados después de su desarrollo los síntomas son menos marcados (Gómez 2008). Las plantas muestran una considerable defoliación con muerte apical, pocos años después de ocurrida la infección. Se presenta un moteado y amarillamiento generalizado. Se desarrollan brotes múltiples con hojas pequeñas, pálidas y moteadas que crecen en posición erecta (“orejas de conejo”), floración fuera de época, retraso del crecimiento, caída de frutos y hojas, frutos deformes de tamaño pequeño con pobre coloración, sabor amargo y semillas deformes. Los síntomas se pueden confundir con deficiencias minerales (Bove 2006).



Figura 3. Síntomas del HLB: Amarillamiento de los brotes, moteado de las hojas, frutos deformes, caída de hojas y frutos.

Trasmisión

La enfermedad se transmite principalmente por insectos vectores (Figura 4) de los cuales existen dos géneros *Diaphorina citri* Kuwayama (Tirtawidjaja *et al.* 1965; Salibe y Cortez 1968; Martínez y Wallace 1967; Capoor *et al.* 1967) en Asia y América y *Trioza erytreae* (McClellan y Oberholzer 1965) en África. Pero también puede transmitirse por yemas infectadas (injerto). La distribución de la bacteria dentro de un árbol infectado puede ser irregular, por lo cual no todas las yemas contendrán la bacteria o transmitirán la enfermedad; cuanto mayor sea el tejido del floema incluido en el inóculo, mayor será la probabilidad de transmisión por injerto, otras formas de transmisión de la enfermedad es el movimiento de plantas enfermas de una región a otra; se ha demostrado que la enfermedad puede transmitirla también una planta parásita del género *Cuscuta*; no se ha probado que se transmita por semilla.



Figura 4. Adultos de los vectores *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae*.

Vector de la enfermedad en México

El vector del HLB en México es *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (conocido como el psílido asiático de los cítricos) el cual es un insecto plaga con categoría cuarentenaria que afecta a todas las especies de cítricos (Wooler *et al.* 1974). *Diaphorina citri* se caracteriza por presentar antenas cortas (0.48 mm), conos genales aplanados y anchos con ápices angostos redondeados o truncados; alas anteriores hialinas, 2.4 veces más largas que anchas, angostas en su base y ensanchadas hacia el ápice, con patrones de maculación en forma de bandas que se cruzan, ápice redondeado y sin pterostigma visible. Edeago con el primer segmento curvado (Yang 1984; Halbert y Manjunath 2004). Los machos son ligeramente más pequeños que las hembras y con la punta del abdomen roma, mientras que el abdomen de la hembra termina en una punta bien marcada (Aleman *et al.* 2007). El ciclo de vida comprende huevo, ninfa y adulto (Figura 5), dura de 20 a 47 días promedio de acuerdo a las condiciones climáticas. El huevo, de 0.3 mm, es ovoide y de color amarillo a anaranjado. La ninfa pasa por cinco estadios en los cuales siempre es móvil, la longitud varía desde 0.25 hasta 1.7 mm y generalmente son de color amarillo, el adulto es pequeño, midiendo de 2.5 a 4.0 mm. El insecto se alimenta de la savia que circula por el floema en la planta en donde se aloja el patógeno. Debido a los hábitos alimenticios del liivido, produce daño en los brotes jóvenes de los cuales prefiere alimentarse, consecuentemente provoca que las hojas se enrollen y retuerzan. Se alimentan por el envés de las hojas, aunque cuando hay altas poblaciones, se les puede observar formando grupos tanto en el haz como en el envés. Se les puede reconocer por la posición que adoptan durante la alimentación, donde la cabeza está pegada a la superficie de la hoja, mientras que el extremo distal del cuerpo está levantado, formando un ángulo de 30 a 45° con respecto a la superficie. El rango de temperaturas más favorable se presenta entre 22 y 29°C. Tanto las altas como las bajas temperaturas son perjudiciales para el incremento de su densidad poblacional. Este liivido no tiene diapausa y sus poblaciones declinan en los períodos en que las plantas no presentan brotación.

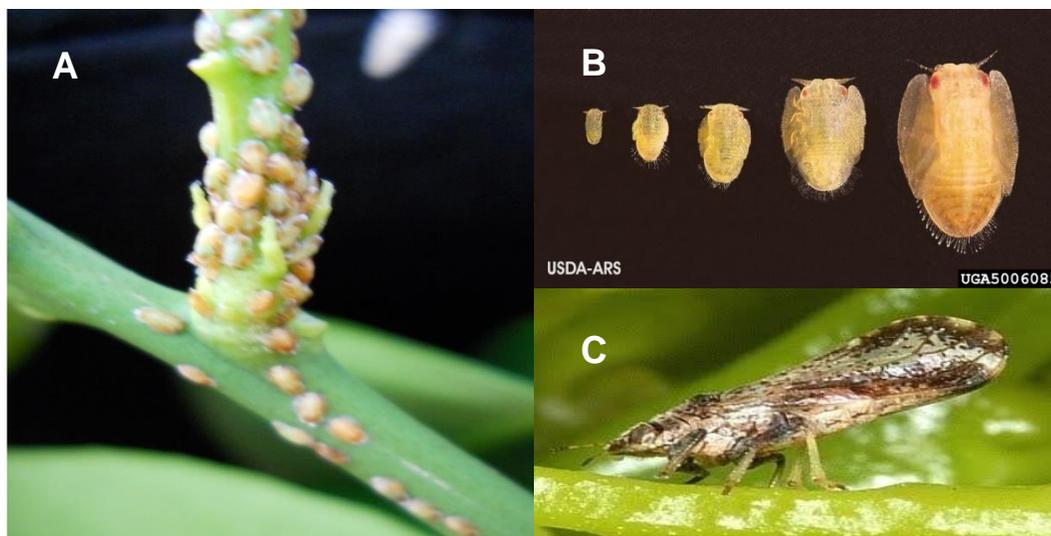


Figura 5. A y B instares ninfales, C adulto de *Diaphorina citri* Kuwayama.

Control del vector

A nivel mundial la estrategia de control se encuentra basada en disminuir al máximo al vector de la enfermedad, para lo cual se contempla la implementación de una serie de prácticas fitosanitarias (Aubert *et al.* 1996; Da Graca). En México se llevan a cabo una gran variedad de prácticas fitosanitarias en las cuales se involucra a productores, viveristas, organismos auxiliares de sanidad vegetal (OASV) y las instituciones de investigación y enseñanza del país (SENASICA 2010. www.senasica.gob.mx).

Para el control del vector se puede hacer uso de una gran variedad de productos químicos existentes en el mercado los cuales han demostrado proporcionar un efectivo control del psílido entre los cuales se encuentran los piretroides, fosfatos orgánicos, carbamatos, neonicotinoides, aceites de horticultura, etc. (Khangura *et al.* 1984; Rae *et al.* 1997) pero estos insecticidas, además de incrementar el costo de producción; pueden ocasionar daños en los ecosistemas. Por lo cual se requiere desarrollar e implementar programas de control más ecológicos y económicos que tengan menor efecto dañino en

la naturaleza, el control biológico es una buena alternativa con que se cuenta para combatir al vector.

Existe una diversidad de enemigos naturales que se alimentan de *D. citri* (depredadores) ente los cuales se encuentran arácnidos, crisópidos, sírfidos y coccinélidos; algunos insectos parasitoides, *Tamarixia radiata* Waterston y *Diaphorencyrtus aligarhensis* entre los más efectivos (Vacaro *et al.* 2006).

Además se han determinado diversas especies de hongos entomopatógenos que podrían tener potencial para utilizarse en el control del vector incluyendo a *Isaria* antes *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith (Samson 1974; Subandiyah *et al.* 2000), *Hirsutella citriformis* Speare (Rivero-Aragon y Grillo-Ravelo 2000; Subandiyah *et al.* 2000; Étienne *et al.* 2001; Cabrera *et al.* 2004; Hall, *et al.* 2012), *Cephalosporium lecanii* Zimm (*Verticillium lecanii*) (Rivero-Aragon y Grillo-Ravelo 2000; Xie *et al.* 1988), *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Rivero-Aragon y Grillo-Ravelo 2000), *Cladosporium* sp. nr. *oxysporum* Berk. y Curtis (Aubert 1987) Y *Capnodium citri* Berk. y Desm. (Aubert 1987) los cuales se han encontrado parasitando a *D. citri* alrededor del mundo. En México se ha detectado a *Hirsutella citriformis* causando epizootias en algunas de las regiones citrícolas (Reyes-Martínez *et al.* 2010; Reyes-Rosas *et al.* 2010; Sánchez-Peña *et al.* 2011).

Los hongos superan a cualquier invertebrado en el control biológico, debido entre otras razones a que la infección de sus huéspedes se da por contacto a través de la cutícula sin necesidad de ingerirlo; además tienen un ciclo de vida corto que se traduce en un potencial alto de reproducción y en ocasiones son endoparásitos obligados de un huésped específico (Feng *et al.* 1994; Jenkis *et al.* 1998). Otra ventaja del uso de hongos en el control biológico es que pueden vivir como saprófitos en ausencia de sus huéspedes (Scholler y Ruber 1994) y bajo condiciones adversas son capaces de producir esporas de resistencia las cuales pueden permanecer viables por largo tiempo.

Clasificación taxonómica del género *Hirsutella citriformis*

Hirsutella es un género de hongos de reproducción asexual perteneciente a la familia Ophiocordycipitaceae. Originalmente descrita por el micólogo francés Narcisse Thophile Patouillard en 1892, este género incluye especies que son agentes patógenos de insectos, ácaros y nematodos; hay interés en el uso de estos hongos en el control biológico de plagas de insectos y nematodos ya que presentan características de ser hongos con alta especificidad hacia el blanco.

El hongo se encuentra clasificado como se describe a continuación.

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Subfilum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes (Sung *et al.* 2007)

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Ophiocordycipitaceae

Género: *Hirsutella*

Especie: *citriformis*

Los miembros de este grupo son considerados el estado imperfecto de *Cordyceps Ophiocordyceps* o *Torrubiella* (Tananda y Kaya 1993).

Hirsutella citriformis presenta micelio septado, fino y hialino con un diámetro de 1.7 a 2.3 micras, fiálides con bases esféricas de aproximadamente 4 – 8.5 micras de largo, cuello de la fiálide largo y delgado de 20 a 35 micras de largo que no presenta ramificaciones y termina en una única conidia elongada, alantoide-cimbiforme (forma de gajo de naranja), de 5-8 x 1.7-2.0 micras rodeadas de una capa mucilaginosa de forma ovoide o de limón de 8 micras de largo y 6 micras de ancho que frecuentemente se

disuelve en agua (Hywel-Jones 1997; Subandiyah *et al.* 2000; Alvarez *et al.* 2003; Cabrera *et al.* 2004; Meyer *et al.* 2007; Sánchez-Peña *et al.* 2011) (Figura 6).

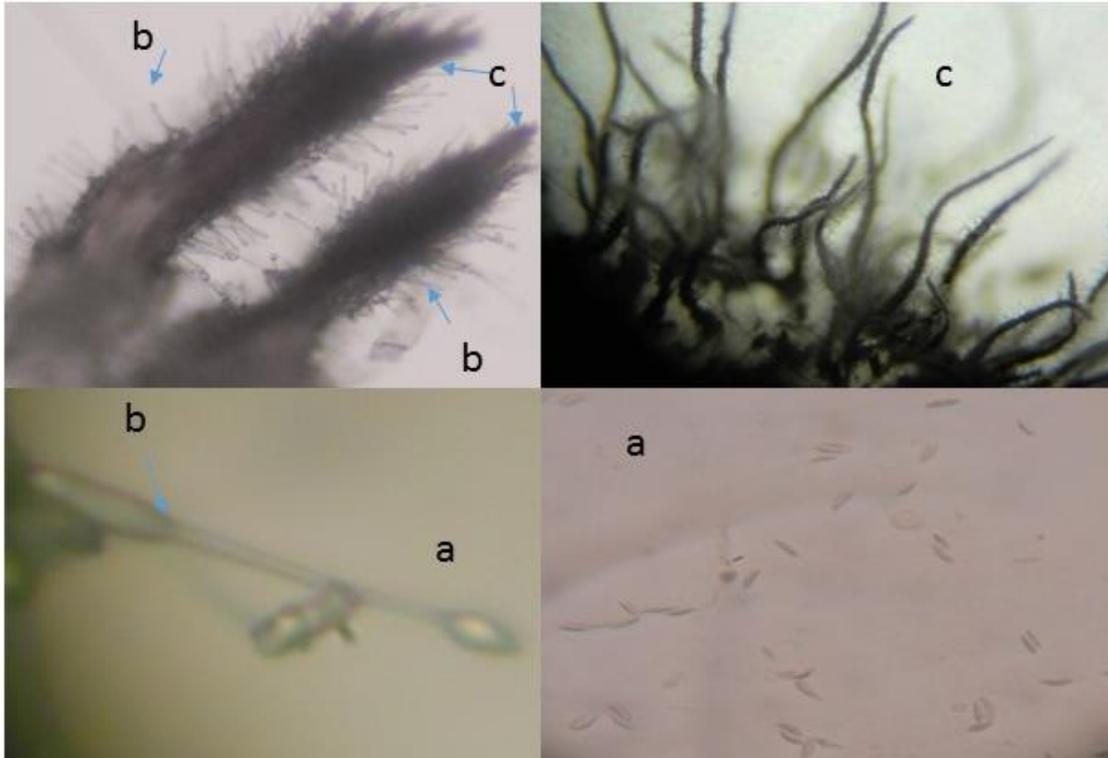


Figura 6. *Hirsutella citrifomis* (a) conidias (b) fiálides típicas (c) sinemas.

Origen y Distribución geográfica de *Hirsutella citrifomis*

Hirsutella citrifomis es originario probablemente de Asia ya que los primeros reportes de su presencia provienen de ese continente y tal vez se haya distribuido a otras regiones geográficas en diferentes países por el movimiento que han tenido los insectos de los cuales es parásito, ha sido posible encontrar al hongo en diversas regiones de clima tropical y subtropical en diversos países. En la Tabla 1 se muestra la distribución geográfica de donde se ha aislado a *H. citrifomis*.

En México el interés que se tiene por encontrar controladores de *Diaphorina citri*, insecto que transmite el huanglongbing (HLB), ha permitido detectar la presencia de *H. citrifomis* en diversas regiones citrícolas del país (Tabla 2, Figura 7)

Tabla 1. Distribución geográfica de *H. citrifomis* en Asia, Africa y América

País	Localidad	Referencia
	Hawaii	Speare 1920
India		Petch 1923
Malasia		Sajap 1993
Indonesia	Java central	Subandiyah <i>et al.</i> 2000
	Isla Guadalupe	Etienne <i>et al.</i> 2001
	Isla Reunión	Aubert 1987
Cuba		Alvarez <i>et al.</i> 1994
	Carmelina, Cienfuegos; Morón y Ceballos, Ciego de Ávila; San Antonio de los Baños, La Habana	Cabrera <i>et al.</i> 2004
	Jovellanos, Matanzas	Alvarez <i>et al.</i> 2003
	Jaguey El Grande, Matanzas	Rodríguez-Toledo <i>et al.</i> 2008
Argentina	Los Hornos y la Plata, Buenos Aires	Toledo <i>et al.</i> 2007
Estados Unidos	Polk, Marion y Hendry, Florida	Meyer <i>et al.</i> 2007
	Indian River, Florida	Hall <i>et al.</i> 2012

La presencia del hongo en una gran cantidad de municipios en un mismo estado del país nos indica que es posible que se encuentre presente en otras regiones de los mismos estados y en la mayoría de las regiones citrícolas del país aunque no se haya reportado su presencia.

Tabla 2. Estados de la República Mexicana en los cuales se ha detectado a *Hirsutella citriformis*

Estado	Localidad	Referencia
Tamaulipas	Rio Bravo Gomez Farías y Llera	Reyes-Rosas et al. 2010 Sánchez-Peña et al. 2011
Yucatán	Mocochá	Pérez-González et al. 2012
Tabasco	Huimanguillo	Pérez-González et al. 2012
San Luis Potosí	Xolol	Pérez-González et al. 2012
Quintana Roo	Nuevo Israel	Pérez-González et al. 2012
Campeche	Edzna	Pérez-González et al. 2012
Chiapas	Tapachula	Pérez-González et al. 2012
Veracruz	Tlapacoyan La Laja de Colomán, Tuxpán Troncones, Ixtacuaco y Dos Cerros Papantla, Gutiérrez Zamora y Tlapacoyan Tlapacoyan Troncones, Ixtacuaco y El Lindero	González et al. 2008 Preza-Durán 2011 sin publicar Guizar-Guzmán et al. 2012 Pérez-González et al. 2012 Hernández-Guerra et al. 2013
Colima	Tecomán	Pérez-González et al. 2012
Oaxaca	Santa Rosa de Lima, Villa de Tututepec de Melchor Ocampo	Pérez-González et al. sin publicar
Hidalgo	Santa Ana	Pérez-González et al. sin publicar



Figura 7. Estados de la República Mexicana de los cuales se ha aislado a *Hirsutella citriformis*.

Insectos asociados a *Hirsutella citriformis*

H. citriformis es una especie típicamente synnematoso que infecta a una amplia gama de hemípteros incluyendo varios insectos vectores de enfermedades de las plantas. En la naturaleza, este hongo es conocido por causar epizootias en diversas poblaciones de insectos, incluyendo la tolva de la planta de café, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae), *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liividae), *Myndus crudus* (Hemiptera: Cixiidae), *Heteropsylla cubana* (Hemiptera: Psyllidae) y *Leptophasa constricta* (Hemiptera: Tingidae).

H. citriformis se ha encontrado parasitando de manera natural a diversos insectos hemípteros (Tabla 3) a los cuales se ha visto que controla disminuyendo la

población de los mismos cuando se tienen las condiciones adecuadas para su desarrollo (temperatura de 25-28 °C y humedad relativa cercana o mayor al 80 %).

En los últimos años ha atraído la atención como agente potencial de control biológico para el psílido *Diaphorina citri* Kuwayama, insecto que se encuentra presente en la mayoría de las regiones cítricas a nivel mundial y del cual ha sido aislado con frecuencia por diversos investigadores.

Tabla 3. Hospederos de los cuales se ha aislado a *Hirsutella citriformis*.

Insecto parasitado	Orden	Distribución	Referencia
Fulgoroidea	Hemiptera	Nueva Zelanda	Speare 1920
<i>Ricania discalis</i>	Hemiptera	Nueva Zelanda	
<i>Perkinsiella sacharicida</i>	Hemiptera	Hawaii	
<i>Siphanta acuta</i>	Hemiptera	Hawaii	
<i>Pentatomido</i>	Hemiptera	India	Petch 1923
<i>Bothriocera venosa</i>	Hemiptera	Puerto Rico	Gregory y Martorell 1940
<i>Leptopharsa constricta</i>	Hemiptera	Estados Unidos	Wolcott 1941 Stahler 1945
<i>Corythuca ulmi</i>	Hemiptera	Estados Unidos	Evinston y Pepper 1945
<i>Heteropsylla cubana</i> Crawford	Hemiptera	Malasia	Sajap 1993
<i>Oliarus dimidiatus</i>	Hemiptera	Argentina	Toledo et al. 2007
<i>Diaphorina citri</i>	Hemiptera	Isla Reunión	Aubert 1987
		Cuba	Alvarez et al. 1994 Cabrera et al. 2004 Rodríguez-Toledo et al. 2008
		Indonesia	Subandiyah et al. 2000
		Isla Guadalupe	Etienne et al. 2001

Florida	Meyer et al. 2007
Florida	Hall et al. 2012
Veracruz, México	González et al. 2008
Tamaulipas, México	Reyes-Rosas et al. 2010
Tamaulipas, México	Reyes-Martínez et al. 2010
Veracruz, México	Preza-Durán et al. 2011
Veracruz, México	Guizar-Guzmán et al. 2012
Tabasco, México	Pérez-González et al. 2012
San Luis Potosí, México	Pérez-González et al. 2012
Quintana Roo, México	Pérez-González et al. 2012
Yucatán, México	Pérez-González et al. 2012
Campeche, México	Pérez-González et al. 2012
Chiapas, México	Pérez-González et al. 2012
Veracruz, México	Pérez-González et al. 2012
Colima, México	Pérez-González et al. 2012
Veracruz y Puebla, México	Hernández-Guerra et al. 2013
Oaxaca, México	Pérez-González et al. sin publicar
Hidalgo, México	Pérez-González et al. sin publicar

Hongos entomopatógenos reportados sobre *Diaphorina citri*

Entre los hongos entomopatógenos que se han reportado infectando a *D. citri* se encuentra *Hirsutella citriformis* Speare (Rivero-Aragon y Grillo Ravelo 2000; Subandiyah *et al.* 2000; Etienne *et al.* 2000; Meyer *et al.* 2007; Hall *et al.* 2012), *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*; Samson 1994; Subandiyah *et al.* 2000; Meyer *et al.* 2008), *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* Zimm. (Rivero-Aragon y Grillo-Ravelo 2000), *Beauveria bassiana* (Padulla y Alves 2009), y *Cladosporium* sp. nr. *Oxysporum* Berk. y Desm. (Aubert 1987).

Epizootias de *Hirsutella citriformis* sobre *Diaphorina citri*

A *Hirsutella citriformis* se le ha encontrado ocasionando epizootias de manera natural sobre *Diaphorina citri* en diversas regiones citrícolas, de esta manera se tiene que Etienne *et al.* (2001), citado por Halbert y Manjunath (2004), señaló que es común observar al hongo *Hirsutella citriformis* Speare, controlando al insecto vector cuando la humedad relativa era mayor del 80%. En un estudio realizado en Cuba sobre hongos entomopatógenos, Álvarez *et al.* (1994), encontraron ninfas y adultos de *D. citri*, parasitados por *Hirsutella citriformis* Speare en árboles de limón mexicano *Citrus aurantifolia* Swingle y en plantas de *Murraya paniculata* (Lin) Jack. Por su parte, Subandiyah *et al.* (2000) en Indonesia observaron tasas de infección de 82.9% y de 52.2% en los meses de septiembre, febrero y julio, cuando la humedad relativa era mayor del 80% durante los meses de muestreo. Mientras que Aubert (1987) reportó para la Isla Reunión una alta mortandad de adultos del liivido, cuando la humedad relativa era superior al 88%.

En México igual que en otros países, se ha detectado la presencia de *H. citriformis* parasitando a *D. citri* cuando se tiene humedad relativa cercana o superior al 80 %. En Tuxpan, Veracruz, México, González *et al.* (2008), en el mes de marzo detectaron una tasa de infección del 21.1% de *Hirsutella* sp. en *D. citri*, cuando se tenía humedad relativa entre 50% a 60%. Reyes-Martínez *et al.* (2010) reportaron la presencia de *H. citriformis* en el sur de Tamaulipas (municipios de Ciudad Victoria, Mante, Gómez

Farías y Llera); donde observaron de 0 a 43 % de insectos micosados en árboles de naranja y en *Murraya paniculata* el 95 % de los insectos muertos presentaban micosamiento por el hongo. Reyes-Rosas *et al.* (2010) reportaron epizootias en la región citrícola de Rio Bravo, Tamaulipas, en los meses de septiembre y noviembre cuando se tuvo humedad relativa cercana al 80 % y con temperaturas promedio entre los 25 y 28 °C., por otro lado Hernández-Guerra *et al.* (2011) observaron que la presencia de insectos micosados por *H. citriformis* en las regiones citrícolas de Troncones en Misantla e Iztacuaco en Tlapacoyan, Veracruz, fue mayor cuando la humedad relativa era superior al 80 % y la temperatura fluctuaba entre 23 y 26 °C.

Actividad biológica

El proceso de infección del insecto por *H. citriformis* al igual que otros hongos entomopatógenos, inicia cuando los conidios recubiertos por la capa mucilaginosa entran en contacto con la superficie externa de la cutícula del insecto; los conidios de este hongo son hidrofílicos a diferencia de los conidios de muchos hongos Hyphomycetes en los cuales los conidios son hidrofóbicos, y esta característica junto con la capa mucilaginosa con la cual cuentan parece ser la que facilita la adherencia del conidio al insecto. Después de adherirse se forma el tubo germinativo, el cual penetra al hemocele, con la ayuda de la secreción de diversas enzimas proteolíticas y quitinolíticas, invade el hemocele el cual es rico en nutrientes y entonces secreta diversas toxinas; posteriormente se reproduce en el interior usando los tejidos del insecto, desarrollando numerosos cuerpos hifales (Meyer *et al.* 2007) para emerger del insecto ya muerto, produciendo las estructuras morfológicas típicas.

Producción a nivel laboratorio

Se conoce o se tiene registrada poca información sobre el cultivo del hongo *H. citriformis*, los investigadores que lo han aislado y cultivado reportan que es un hongo de crecimiento lento que puede formar o no sinemas en el medio de cultivo; entre estos reportes se cuenta con el trabajo de Subandiyah *et al.* (2000) quien aisló y cultivó al

hongo en placa y observó que a las 5 semanas se producían sinemas de aproximadamente 5 mm de largo y de color gris; mientras que González *et al.* (2008) cultivaron al hongo en el medio papa dextrosa agar donde formó sinemas de aproximadamente 2 mm de largo. Por otro lado, Meyer *et al.* (2007) cultivaron al hongo en agar Sabouraud dextrosa enriquecido con extracto de levadura al 1% y reportaron que el hongo creció 3.5 ± 0.1 cm de diámetro después de 21 días de color gris claro, se mantuvo el cultivo hasta por 5 semanas y no obtuvieron esporulación, lo cultivaron en arroz estéril y aquí a las 6 semanas presentaba abundante micelio y múltiples sinemas.

Por otra parte Sánchez-Peña *et al.* (2011) cultivaron a *H. citrifomis* en PDA enriquecido con extracto de levadura al 0.5% en donde obtuvieron crecimiento en color café grisáceo y formación de fiálides pero sin obtención de sinemas. También Reyes-Martínez *et al.* (2010) cultivaron a *Hirsutella* en 3 diferentes medios de agar y reportaron una tasa de crecimiento de 2 a 3 mm por semana.

Otros tipos de cultivo de laboratorio son llamados mixtos porque en ellos se siembra en caja de petri y de ahí se toma inóculo para cultivo en medio líquido, el crecimiento en este medio de cultivo es utilizado para inocular sustratos vegetales (granos de gramíneas), desechos industriales y agrícolas entre los que se encuentran el afrecho, pasto forrajero, bagazo de uva, entre otros. De esta forma, utilizando esta metodología, Romero-Rangel *et al.* (2010) usaron cuatro diferentes medios de cultivo líquido para producción de blastosporas y biomasa miceliar (líquido de remojo de maíz, medio de peptona de colágeno, medio de casaminoácidos y medio de peptona de caseína) y en el medio de líquido de remojo de maíz obtuvieron buena producción de micelio, sin blastosporas, mientras que en el de peptona de colágeno y Casaminoácidos fue alta la producción de blastosporas. Leal-López *et al.* (2010) trabajaron inoculación de blastosporas de *Hirsutella* en avena laminada, germen de trigo y salvado de trigo y reportaron muy buena conidiación en avena laminada a los 3 días de incubación; mientras que Reyes-Martínez *et al.* (2010) cultivan a *Hirsutella* en trigo estéril en el cual reportaron crecimiento abundante de micelio y sinemas y una esporulación de 7.6×10^7 conidias por gramo de sustrato.

Todos los datos que se tienen son de cultivo de *H. citrifomis* a nivel laboratorio ya que a la fecha no se tienen reportes de la producción a nivel industrial para producción de bioinsecticidas.

Producción, formulación, aplicación y mercadeo

A la fecha se tienen muchos problemas concernientes a la producción, aplicación formulación y mercadeo de bioinsecticidas los cuales tienen que ser resueltos.

Los requerimientos para el éxito, producción comercial y uso de hongos como agentes de control biológico que se deben tomar en cuenta están la producción en masa la cual debe ser selecta, con crecimiento rápido, esporulación abundante y alta patogenicidad para el blanco; el costo de producción debe ser mínimo, lo cual puede lograrse desarrollando un medio de cultivo de composición simple, económico, disponible en grandes cantidades y con un proceso de producción sencillo que minimice el trabajo, de esta forma se han evaluado diferentes tipos de sustratos naturales, principalmente arroz, trigo, maíz, frijol, soya, avena, pero los más utilizados son arroz y trigo.

La formulación del hongo es el proceso mediante el cual el ingrediente activo, es decir los conidios del hongo, se mezclan con materiales inertes, acarreadores o vehículos, solventes, emulsificantes y otros aditivos. Estos materiales inertes ayudan a aumentar volumen y es el vehículo para dispersar las conidias. Todo esto se hace con el fin de lograr una buena homogeneidad y distribución de las partículas del hongo, para poder ser manipuladas y aplicadas adecuadamente

Una buena formulación es la base para el éxito de un bioplaguicida de origen microbiano; la posibilidad de obtener productos adecuados depende de las propias características del microorganismo y su relación con los componentes de la formulación (excipientes) y el ambiente de almacenamiento (Tanzini *et al.* 2001). La estabilidad, viabilidad y persistencia en campo de los entomopatógenos es en gran medida

determinada por el tipo de formulación (Cortez-Madrigal 2006). Para ser formulado, la viabilidad del hongo no debe ser menor de 95 % y el contenido de humedad entre 4 - 6 %. (Monzón 2001). Los materiales utilizados en la formulación no deben tener actividad biológica; ni afectar la viabilidad y actividad del hongo, deben ser inocuos al ambiente, presentar características físicas adecuadas para mezclarse con los conidios; facilitar la aplicación del producto y ser económicamente rentables (Carballo 1998).

Los productos microbianos deben ser formulados para diferentes plagas blanco y finalmente dichos productos puedan ser almacenados por períodos largos y bajo condiciones naturales a temperatura ambiente, sin requerir refrigeración y sin que se pierda su capacidad tóxica y viabilidad.

La aplicación de los hongos entomopatógenos formulados en polvo o en aceite, es una de las más usuales, ya que el hongo permanece viable un cierto período de tiempo y es semejante a la de cualquier otro producto. El hongo aplicado se establece en el campo, ya sea en el suelo, las plantas o sobre la plaga infectiva.

Para su mercadeo se tienen diferentes formulaciones, una de estas, en forma de polvo seco o polvo humectable, otras son líquidas o emulsificables, a base de aceites, de los cuales se han obtenido diversos productos comerciales bioinsecticidas a base de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii*, *Isaria fumosorosea*, los cuales se han producido en diversos estados como Colima, Guanajuato, Sinaloa y Oaxaca para el control de plagas en cultivos de hortalizas, gramíneas y leguminosas.

Ventajas y desventajas del uso de hongos entomopatógenos.

Las ventajas que presentan los hongos entomopatógenos son: (1) tienen alto grado de especificidad para el control de la plaga sin afectar a insectos benéficos (depredadores y parasitoides); (2) no dañan el ambiente ni ocasionan problemas de salud a mamíferos como lo hacen algunos insecticidas químicos; (3) infectan de distintas maneras y no ocasionan resistencia por lo cual pueden ser usados de manera prolongada; (4) secretan

sustancias tóxicas que pueden aumentar su toxicidad; (5) pueden transmitirse de un insecto a otro.

Las desventajas son: (1) actúan matando al insecto con mayor lentitud que los insecticidas químicos, 2 a 3 días o hasta una semana, en vez de 2 a 3 horas, respectivamente; (2) necesitan condiciones ambientales específicas como humedad, temperatura o períodos de luz para poder actuar; (3) su propia especificidad sobre el insecto blanco limita su uso sobre otras plagas; (4) tienen menor tiempo de vida de anaquel que los insecticidas químicos y; (5) pueden ocasionar daño en la salud de personas inmunosuprimidas y 6) necesidad de reaplicaciones sucesivas.

JUSTIFICACIÓN

El HLB está considerada como una de las enfermedades más destructivas para la citricultura mundial por ocasionar daños severos y afectar a todas las especies comerciales de cítricos. La enfermedad es originaria de la India pero se le reportó por primera vez en China y de ahí ha pasado fronteras para llegar a establecerse mundialmente en casi todas las regiones citrícolas. En México el líquido vector de la enfermedad (*Diaphorina citri* Kuwayama) se encuentra presente en los 23 estados citrícolas y la enfermedad (HLB) se tiene reportada en Yucatán, Campeche, Tabasco, Sinaloa, Michoacán, Baja California Sur, Quintana Roo, Hidalgo, Colima, Nayarit, Jalisco y Chiapas y se encuentran en riesgo los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Sonora y Veracruz en los cuales ya se han detectado vectores portando a la bacteria causante del HLB (Senasica 2013, www.senasica.gob.mx).

El que se haya extendido a tantos estados de la República en tan corto tiempo ocasiona un gran problema en el país ya que la industria citrícola es muy importante por generar más de 70,000 empleos directos y 250,000 indirectos. México es el cuarto productor mundial de cítricos en el mundo.

Actualmente la única forma de controlar a la enfermedad es eliminando el vector y para ello se usan insecticidas químicos; pero éstos además de que incrementan el costo de producción, contaminan y afectan a los ecosistemas de las regiones en donde son aplicados además de que pueden ocasionar resistencia en los insectos, por lo cual es necesario el desarrollar nuevas estrategias para el control del vector.

Una observación interesante es que se ha visto que *Hirsutella citriformis* tiene la capacidad de matar al vector adulto además de tener especificidad por el insecto blanco, por lo que el estudio de este patógeno y las condiciones óptimas para su producción y actividad tóxica serían de gran relevancia en este tema.

Esperamos que con los resultados obtenidos en este trabajo, se pueda avanzar en el desarrollo de un bioinsecticida que sirva para el control del HLB que tiene en riesgo la industria citrícola en México y el mundo.

OBJETIVO GENERAL

Aislamiento y cultivo de *Hirsutella* en medios sólidos y líquidos, así como la identificación morfológica y molecular de las cepas aisladas y evaluación de la toxicidad contra *Diaphorina citri*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Aislamiento del hongo entomopatógeno *Hirsutella* de insectos micosados de *Diaphorina citri* y recolectados de diversas zonas citrícolas de nuestro país
- 2.- Caracterización morfológica y morfométrica de las cepas aisladas.
- 3.- Cultivo del hongo en medios de cultivo comerciales de agar, medios líquidos y sustratos vegetales.
- 4.- Implementación de bioensayos en laboratorio contra *D. citri* aplicando conidios y blastosporas producidos por los hongos aislados.
- 5.- Comparación de la patogenicidad de blastosporas y conidios de las cepas aisladas a nivel laboratorio.
- 6.- Selección de las cepas de *Hirsutella* más virulentas.
- 7.- Determinación de la Concentración letal media de conidios de la cepa de *H. citriformis* más tóxicas.
- 8.- Evaluación de la patogenicidad de *Hirsutella citriformis* sobre dos de los depredadores de *D. citri* en bioensayos de laboratorio.
- 9.- Identificación de los exudados producidos por los hongos.
- 10.- Identificación molecular de las cepas aisladas.
- 11.- Determinación de la patogenicidad de *Hirsutella* en bioensayo de campo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Aislamientos de las cepas

Insectos micosados de *D. citri* con signos evidentes de sinemas, colectados en diversos estados de México, se colocaron bajo el microscopio estereoscópico para observar la presencia de conidios. Insectos con sinemas esporulados fueron seleccionados para la obtención directa de cepas monoconidiales de *Hirsutella*. Bajo el microscopio estereoscópico se colectaron conidios a partir de sinemas por adhesión en un pequeño fragmento de medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA, Difco) acidificado (200 μ L/L de ácido láctico 85% agregado después de esterilizar el medio) colocado en una aguja. El fragmento de PDA con los conidios se colocó en el centro de una caja Petri conteniendo el mismo medio de cultivo y sobre él se dispersó 40 μ L de agua estéril. Se incubó a 25 °C de temperatura.

A las 48 horas se extrajo un conidio germinado a partir del cual se desarrolló una cepa monoconidial. Cuando los sinemas no mostraron la presencia de conidios se colocaron fragmentos pequeños del sinema sobre PDA, se incubaron a 25 °C de temperatura y a partir de crecimientos jóvenes se extrajeron puntas de hifa. A partir de las nuevas colonias desarrolladas y una vez observada la presencia de conidios en fiálides (no sobre sinemas), se obtuvo una cepa monoconidial como se mencionó anteriormente.

2. Mantenimiento de los hongos

Las cepas monoconidiales se mantuvieron en activo en el medio PDA y se conservaron por periodo prolongado en tubos con agar inclinado con aceite mineral, también en tubos con agar inclinado y agua estéril (Rodríguez y Gato 2010) y en viales con glicerol al 10% donde se colocó un pequeño fragmento del cultivo mantenidos a -4 °C de temperatura. Las cepas en activo fueron utilizadas para los diversos experimentos llevados a cabo en el estudio.

3. Caracterización morfométrica de *Hirsutella citriformis*

Para la identificación morfométrica de los hongos aislados se realizaron microcultivos. Se cortaron cuadros de agar papa dextrosa (PDA) de aproximadamente 1 cm², se colocaron en portaobjetos estériles contenidos en cajas Petri con papel filtro humedecido con agua estéril. Cada cepa se inoculó por picadura en cada extremo del cuadro de PDA, se colocó un cubreobjetos estéril y se incubó a 25 ± 2 °C hasta obtener el crecimiento de los hongos con sus sinemas característicos (4 semanas). Se retiró el cubreobjetos y se colocó sobre un portaobjetos conteniendo una gota de solución lactofenol azul de algodón. También se desprendió el cuadro de agar del portaobjeto, se colocó una gota del lactofenol azul de algodón y se colocó un nuevo cubreobjetos. Las laminillas se sellaron con esmalte transparente y se observaron al microscopio para realizar mediciones de fiálides, conidios y mucus que rodeaban los conidios usando para ello un micrómetro. Las mediciones se compararon con las reportadas previamente para *H. citriformis*.

4. Cultivo en medios comerciales de agar

4.1. Efecto de la temperatura en el crecimiento radial

A cada caja Petri se le colocó al centro un disco de 0.5 cm de diámetro de inóculo de un cultivo de 2 semanas de cada una de las cepas aisladas, de igual manera que para el ensayo anterior con 5 repeticiones por cepa (para cada medio probado). Se incubaron a temperaturas de 21, 25, 28 y 30°C durante 34 días y el crecimiento radial de cada colonia fue medido una vez a la semana usando dos diámetros cardinales previamente dibujados en la parte baja de cada caja petri como referencia.

4.2 Evaluación del crecimiento radial en 11 diferentes medios comerciales de agar

Se inoculó a cada caja petri usando un disco de 0.5 cm de diámetro de un cultivo de 2 semanas de cada una de las cepas aisladas, de igual manera que en el ensayo anterior con 5 repeticiones/cepa en los medios PDA, PDAY (0.5, 1, 2, 3 y 5%), SDA,

SDAY (0.5 y 1 %), EMA y EMAYP (Anexo). Se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 34 días y el crecimiento radial de cada colonia fue medido tres veces a la semana.

4.3 Evaluación de la producción de conidias

Al final de los 34 días de incubación de los cultivos usados para la evaluación del crecimiento radial, se les agregaron 10 mL de agua destilada estéril a cada caja petri para resuspender los conidios raspando la superficie de la caja con un asa bacteriológica, se realizaron diluciones y el conteo de los conidios producidos por cada una de las cepas se realizó usando la cámara de Neubauer.

4.4 Análisis estadístico

Se usó un diseño multifactorial de $8 \times 4 \times 3$ (cepas x temperaturas x medios) (SPSS 17.0) para el análisis de los resultados de las cepas creciendo a diferentes temperaturas, y un diseño bifactorial de 8×11 (cepas por medios) para el análisis de los resultados de crecimiento radial y conidiación, los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de Tukey $\alpha = 0.05 \%$ (SPSS 17 0).

5. Cultivo en medios líquidos

El inóculo se preparó sembrando a las cepas en PDA, incubando por 2 semanas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Se usaron los medios de Caldo Papa Dextrosa (PDB) y el medio de casaminoácidos (Anexo), diseñado por Jackson *et al.* (1997) modificado en la proporción de casaminoácidos (80 g) y sin la adición de vitaminas. Las cepas de *Hirsutella citriformis* se sembraron en estos medios mediante la adición de 4 cuadros de agar de 1 cm^2 por cada matraz Erlenmeyer bafleado de 250 mL conteniendo 50 ml de medio, se realizaron 3 repeticiones para cada cepa (y tres repeticiones para cada medio). Los matraces se incubaron en agitación a 250 rpm y temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante catorce días.

Se tomaron muestras de 1 mL de cada repetición los días 7, 9, 11 y 14 para realizar el conteo de blastosporas en la cámara de Neubauer.

5.1 Análisis estadístico

Se usó un diseño bifactorial de 8x2 (cepas por medios) para el análisis de los resultados de producción de blastosporas, los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de Tukey $\alpha = 0.05$ % (SPSS 17 0).

6. Cultivo en sustratos sólidos

6.1 Medio de arroz.

El arroz se lavó por tres ocasiones, se remojó en agua caliente por media hora, se escurrió perfectamente y se doró con 20 ml de aceite vegetal /Kg, se agregaron 300 mL de agua /Kg y se coció hasta evaporación. Se colocaron 50 g de arroz en recipientes plásticos de 500 mL y se esterilizó por 20 minutos a 121 °C.

6.2 Inóculo.

Para la preparación del inóculo se usaron cepas incubadas por 6 a 7 semanas con conidiación abundante, se les añadió 30 ml de agua destilada estéril para recuperar los conidios e inocular los recipientes plásticos conteniendo 50 g de sustrato con 8 mL de la suspensión. Se incubaron a 25 ± 2 °C durante 21 días y posteriormente se tomaron muestras de 1 g a las 2 y 3 semanas para contabilizar los conidios en la cámara de Neubauer. El experimento se realizó en tres ocasiones con 3 repeticiones por aislado.

6.3 Análisis estadístico

Se usó un diseño factorial completamente al azar para el análisis de los resultados de conidiación, los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de Tukey $\alpha = 0.05 \%$ (SPSS 17.0).

7. Caracterización de los exudados

A cepas cultivadas por 6 a 7 semanas a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ se les agregó 5 mL de agua destilada (cantidad necesaria para recuperar el volumen a utilizar en los experimentos) estéril para recuperar los diversos exudados que presentaban. Además con jeringa de insulina se tomaron los diversos exudados para identificarlos. Se usó el método de Bradford (Bradford 1976) para identificar proteínas (Anexo) y el método del Fenol-Sulfúrico (Dubois 1956) para carbohidratos (Anexo).

7.1 Identificación por el Método de Bradford

Este es un método colorimétrico que se basa en la unión de un colorante, Coomassie Blue G-250 a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas: una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante. Para la realización de esta prueba, se añadió 1 mL del reactivo de Bradford (Bradford. 1976) a los tubos estándar (ver anexo) y muestras de los exudados problemas. Se leyó la Absorbancia a 595 nm frente al blanco, en el espectrofotómetro (Beckman DU-650, Instrument INC)

7.2 Método del Fenol Sulfúrico

Este también es un método colorimétrico que se basa en el principio de que todos los azúcares incluyendo polisacáridos se deshidratan con ácido sulfúrico concentrado formando furfurales o alguno de sus derivados, los que a su vez se condensan con

fenoles presentes en la mezcla de reacción para dar compuestos de coloración naranja amarillento cuya intensidad se mide espectrofotométricamente (Dubois. 1957). Para esta determinación se colocó 1 mL de la solución de estándares y muestras en un tubo de precipitado de 16 x150 y se adicionó 0.5 mL de fenol al 5% e inmediatamente después se añadió con precaución por las paredes de los tubos 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se dejaron reposar durante 30 minutos, se agitó y leyó en el espectrofotómetro a 490 nm.

8. Caracterización molecular

Las cepas se crecieron en medio de cultivo caldo de dextrosa y papa (PDB), se incubaron en agitación a 250 rpm y 25 °C por 15 días. Posteriormente se colocó una porción de micelio en tubos cónicos de 1.5 mL de capacidad, se lavó en dos ocasiones con el buffer Tris (TE 1 X). Se agregó 250 µL de buffer de lisis (200 mM Tris pH 8.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5% SDS) y se maceró con un pistilo. Se agregó 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 minutos y con ayuda de una micropipeta se recuperó el sobrenadante (este paso se repitió por dos ocasiones). El ADN se precipitó con acetato de sodio (3M; pH 7) e isopropanol, y se lavó con etanol al 70%. El ADN se resuspendió en buffer TE 1X y se agregó RNasa (1µL por cada 10 µL del buffer). Posteriormente se colocó en un gel de agarosa (1 %) teñido con bromuro de etidio (2.3 µL/25mL) para verificar la calidad del ADN extraído.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 25 y 60 µL para observar el producto de PCR y su purificación, respectivamente. Se amplificó la región ITS-1, gen ribosomal 5.8S e ITS-2 utilizando los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA ATA TGC-3'). Para la reacción se utilizó MgCl₂ al 3.5 mM, 4 ng/µL de cada iniciador, 200 µM de dNTP's, 1U de Taq polimerasa, buffer de reacción al 1X y 1 µL de ADN. La PCR consistió de un ciclo de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 60°C por 45 segundos y

elongación a 72°C por 90 segundos, seguida de un paso de elongación final a 72°C por 8 minutos (Robles-Yerena *et al.* 2010).

La amplificación de la región del gen 28S ribosomal se realizó utilizando los iniciadores descritos por Meyer *et al.* (2007) LS1 (5'-AGTACCCGCTGAACTTAAG-3') y LR5 (5'-CCTGAGGGAACTTCG-3'). La amplificación se basó en las condiciones utilizadas por Meyer *et al.* (2007). La mezcla de reacción consistió de MgCl₂ al 2.5 mM, 800 pmol de cada iniciador, 800 μM de dNTP's, 1U de Taq por reacción, buffer de reacción al 1X y 1 μL de ADN. Las condiciones de PCR consistieron de un ciclo de desnaturalización a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 10 segundos, alineamiento a 50°C por 30 segundos y elongación a 72°C por 1 minuto, seguida de un paso de elongación final a 72°C por 10 minutos.

Los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio y se purificaron con el kit de Bio Basic Inc. (EZ-10 Spin column BS354) según instrucciones del fabricante. La secuenciación se realizó en ambos sentidos en la Universidad Nacional Autónoma de México y las secuencias fueron alineadas utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Copyright © 1997-2007 Tom Hall) (Hall, 1999). Las secuencias consenso se analizaron en la página del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) con el algoritmo megablast.

El análisis filogenético de las siete cepas mexicanas se llevó a cabo con secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 y del gen 28S de especies de *Hirsutella* reportadas en el NCBI. Las secuencias se alinearon utilizando el algoritmo MUSCLE del programa MEGA 5.1 (Tamura *et al.* 2011) y se retiraron del alineamiento nucleótidos que se encontraban en los extremos, debido a la falta de éstas secuencias en algunas especies. El alineamiento resultante se sometió a un análisis filogenético utilizando el método de Neighbor-Joining basado en el modelo de dos parámetros de Kimura, con la opción de

Pairwise deletion de los gaps. Para la evaluación de la estabilidad de los árboles se utilizó el método bootstrap con 1000 repeticiones.

9. Bioensayos de laboratorio con adultos y ninfas de *Diaphorina citri*

Para los bioensayos se usaron ocho cepas de *Hirsutella citriformis* (INIFAP-Hir-1, INIFAP-Hir-2, INIFAP-Hir-4, INIFAP-HIR-5, INIFAP-Hir-6, INIFAP-Hir-7, IB-Hir-1 e IB-Hir-2) aisladas de insectos micosados de *Diaphorina citri* de los estados de Tabasco, Yucatán, San Luis Potosí, Quintana Roo, Campeche, Chiapas, Veracruz y Colima (Figura 8).



Figura 8. Cepas utilizadas en los bioensayos de laboratorio.

9.1 Obtención de ninfas y adultos de *D. citri*

a) Obtención de adultos. Insectos adultos posados en brotes de naranja valencia fueron colectados del campo. Para la colecta se utilizó un aspirador bucal adaptado a un depósito de plástico transparente, los insectos una vez capturados fueron transportados al

laboratorio, donde aquellos que presentaban apariencia sana fueron seleccionados para los bioensayos y se descartaron los enfermos, o dañados durante la colecta.

Posteriormente fueron anestesiados con cloroformo usando un algodón impregnado con 80 μ L de cloroformo colocado y sujeto a la parte superior del depósito donde fueron colectados para inmovilizarlos y realizar las aplicaciones de los diferentes tratamientos. Los bioensayos fueron realizados en las instalaciones del Campo Experimental INIFAP de General Terán, Nuevo León, México.

b) Obtención de ninfas. Brotes infestados con ninfas de diferentes instar fueron colectados en campo y transportados al laboratorio.

9.2 Procedimiento de Bioensayos

9.2.1 Bioensayos de conidias aplicadas por contacto.

a) Inóculo. Las diferentes cepas aisladas se sembraron colocando un pequeño trozo de inóculo de cultivos de dos semanas al centro de cajas de Petri de 90 mm de diámetro conteniendo medio de cultivo PDAY al 0.5 %, se incubaron durante 6 a 7 semanas a 25 ± 1 °C hasta alcanzar conidiación.

Estos cultivos se utilizaron tanto para los bioensayos por contacto así como para asperjado de conidios en adultos y bioensayos con ninfas.

b) Procedimiento. Insectos adultos anestesiados se transfirieron a cultivos esporulados de cada una de las cepas de *H. citrifomis* donde permanecieron de 1 a 2 minutos; insectos control se transfirieron al medio PDAY estéril por el mismo tiempo. Como arena experimental se utilizaron recipientes plásticos con capacidad de 150 mL (altura 6 cm, diámetro superior e inferior 8 y 5 cm respectivamente), a los cuales se colocó en el fondo una capa de esponja de 2 cm de grosor, saturada con agua destilada estéril para propiciar un ambiente con alta humedad. Quince insectos tratados y no tratados y una hoja de brote tierno de naranja Valencia fueron colocados sobre la esponja (Figura 9). Cada 2 o 3 días se reemplazó la hoja y se restableció la humedad en la esponja con agua destilada estéril; al mismo tiempo se contabilizó el número de insectos muerto y/o vivos. Los tratamientos se colocaron en una cámara bioclimática a 26 ± 1 °C,

76 ± 4 HR y 16:8 horas de luz: oscuridad. Por cada tratamiento se usaron 7 repeticiones con 15 adultos en cada una de ellas. Estos se mantuvieron durante 27 días registrando la mortalidad cada 3 o 4 días

9.2.2 Bioensayos de conidias aplicadas por asperjado en adultos.

a) Inóculo. A cultivos de las diferentes cepas mantenidas durante 6 - 7 semanas, como en el bioensayo anterior, se prepararon agregando 10 mL de agua estéril a cada caja petri para resuspender los conidios raspando la superficie de la caja con un asa bacteriológica. La suspensión se mezcló durante 3 minutos, se cuantificaron las esporas usando la cámara de Neubauer ajustando la concentración a 1×10^6 conidios/mL.

b) En el primer bioensayo por asperjado se usó la suspensión solo con agua destilada.

c) En el segundo bioensayo con asperjado de conidios, se añadió a la suspensión goma de acacia al 1 % como adherente. La preparación de los inóculos se realizó una hora antes de realizar los bioensayos.

d) Para realizar el bioensayo de asperjado de conidios, se seleccionaron dos de las mejores cepas obtenidas del bioensayo por contacto (INIFAP-Hir-1 e IB-Hir-2). Insectos anestesiados se colocaron sobre papel absorbente en una bandeja plástica y fueron asperjados a una distancia aproximada de 15 cm por 3 ocasiones consecutivas. Los insectos inoculados fueron colocados en las mismas unidades usadas como arena experimental en los diferentes bioensayos y se evaluó la mortalidad y/o sobrevivencia al mismo tiempo que en el bioensayo por contacto. Los insectos control en el bioensayo en el cual se aplicaron los conidios solo resuspendidos en agua, se inocularon asperjando agua y en aquellos que se usó goma de acacia se asperjaron con una solución de goma de acacia al 1%

e) El procedimiento de evaluación y condiciones de los bioensayos, fue el mismo descrito en el bioensayo de contacto, mantenidos a las mismas condiciones y en los mismos recipientes.

9.2.3 Bioensayos de conidios aplicados por inmersión en ninfas.

a) Inóculo. Se utilizó el mismo tipo, como en el bioensayo contra adultos, aplicando la concentración de 1×10^6 conidios/mL.

b) Procedimiento. Para la arena experimental se usaron tubos Eppendorf de 1.5 mL a los cuales se les agregó un mL de agua estéril, se colocó el brote y se cubrió con cinta para emplear con el fin de conservar la humedad y turgencia del brote, se colocaron en vasos de unicel de medio litro, se cubrió con tela de organza para evitar que escaparan los adultos que emergieran durante el desarrollo del bioensayo.

Los brotes con ninfas del segundo y tercer instar se sumergieron en la suspensión de conidios durante 10 segundos, se escurrieron antes de colocarlos en la arena experimental, mientras que al testigo se agregó solo agua destilada estéril. Se usaron cinco repeticiones para cada tratamiento. Se colocaron en la arena experimental y se incubaron a 26 °C, HR de 70% y 16:8 horas de luz: oscuridad durante 7 días, se evaluó cada tercer día para contabilizar las ninfas muertas y/o micosadas.

9.2.4 Bioensayos de blastosporas aplicadas por asperjado.

a) Cultivo de blastosporas. Se inocularon matraces Erlen Meyer baffleados con 50 ml de caldo PDB a los cuales se agregó a cada uno 4 trozos de 1 cm^2 de cultivos incubados por dos semanas en PDA a 25 ± 1 °C. Los matraces se incubaron en agitación a 250 rpm y 25 °C por 11 días, al final de los cuales ajustó la concentración a 1×10^6 blastosporas/mL.

b) Las blastosporas fueron aplicadas por asperjado usando la misma técnica que para los bioensayos de conidios aplicados por asperjado.

c) El procedimiento de evaluación y condiciones del bioensayo, fue el mismo descrito en el bioensayo de contacto, mantenidos a las mismas condiciones y en los mismos recipientes.

d) Los insectos del testigo fueron inoculados con PDB estéril.

9.2.5 Bioensayos aplicados por espolvoreo.

a) Inóculo. Los conidios de las cepas cultivadas en arroz por 14 días a 25 ± 2 °C de temperatura, se resuspendieron en agua destilada estéril, después se filtraron a través de

gasa estéril, se contabilizaron los conidios ajustando la concentración a 1×10^6 conidios/mL; finalmente se añadió tierra de diatomeas o talco al 5 %, se filtraron al vacío, se secaron a 28°C y se recuperó el inóculo en polvo.

b) Aplicación. Los insectos anestesiados se colocaron sobre papel absorbente en una bandeja plástica, se aplicó el inóculo espolvoreando con salero. A los testigos se les inoculó con tierra de diatomeas o talco. Se realizaron siete repeticiones para cada tratamiento.

c) El procedimiento de bioensayo fue el mismo descrito en el bioensayo de contacto, mantenidos a las mismas condiciones y en los mismos recipientes.

9.3 Registro de la mortalidad de insectos

Los insectos muertos los tres días posteriores al inicio del bioensayo fueron descartados. Cada 3 o 4 días se registró la mortalidad de los insectos iniciando 3 días después de la inoculación, los cadáveres de los insectos que no presentaban el crecimiento típico de *H. citrifomis* se colocaron en cámara húmeda para propiciar la esporulación del hongo.



Figura 9. De Izquierda a derecha, arena experimental, insectos dormidos con cloroformo, inoculación por contacto, insectos en arena experimental, insectos muertos y micosados.

9.4 Bioensayo para determinación de la concentración letal media (CL₅₀).

De los resultados obtenidos del bioensayo con las distintas cepas de *Hirsutella* se seleccionó la cepa con mayor actividad y se le determinó la CL₅₀ y CL₉₀ utilizando seis concentraciones de 1×10^4 , 1×10^5 , 0.5×10^6 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 conidias/mL las cuales se aplicaron por asperjado sobre adultos de *D. citri*. Por cada concentración se usaron siete repeticiones con 15 insectos cada una de ellas, los insectos controles se inocularon con agua destilada estéril. El bioensayo se realizó y evaluó bajo las mismas condiciones que los anteriores bioensayos.

10. Bioensayos con dos depredadores de *D. citri*.

Los adultos del depredador *Hippodamia convergens* fueron colectados en campo y transportados al laboratorio de Entomología del INIFAP donde permanecieron en cuarentena (durante dos semanas) para eliminar aquellos que presentaran signos de parasitismo. Por otra parte, las larvas de *Chrysoperla rufilabris* fueron proporcionadas por el laboratorio de Entomología del INIFAP.

a) Inóculo. Adultos de *Hippodamia convergens* y larvas del primer instar de *Chrysoperla rufilabris* fueron inoculados e incubados de la misma forma que el bioensayo por contacto con *D. citri*

b) Procedimiento. Los insectos de *Hippodamia* fueron alimentados con huevos de *Sitotroga cerealella* y aguamiel y cada tercer día, fueron cambiados a nuevos recipientes con alimento para evitar contaminación por las excretas que producen y al mismo tiempo se realizó el conteo de insectos muertos. Para el bioensayo con *Chrysoperla rufilabris*, la alimentación se realizó usando huevos de *Sitotroga cerealella*, las condiciones y evaluación de la mortalidad fueron similares al bioensayo anterior.

Se realizaron cinco repeticiones con diez adultos para cada cepa a evaluar con adultos de *Hippodamia convergens* y 16 larvas del primer instar para *Chrysoperla rufilabris* (INIFAP-Hir-1, IB-Hir-2, INIFAP-Hir-2 e IB-Hir-1) y para el testigo, las cuales fueron seleccionadas en base a los resultados obtenidos en los bioensayos por contacto.

11. Bioensayo de campo

a) Lugar. El bioensayo de campo se realizó en un huerto de limón persa en Martínez de la Torre, Veracruz, que tiene las coordenadas 20°08'12"N, 97°02'37"W. Previo a establecer el experimento se buscó la presencia de insectos micosados por *H. citriformis* en el huerto para lo cual se seleccionaron 12 árboles del cultivo de limón. La distribución de los árboles a muestrear dentro de la huerta se realizó alternando 6 árboles en el extremo Este del huerto y 6 árboles en el extremo Norte (Figura 10).

b) Muestreo previo. En cada uno de los 12 árboles seleccionados se muestrearon 6 brotes en cada uno, se inició el conteo de los insectos micosados descartando aproximadamente 10 cm de cada brote (brote tierno) buscando a los insectos en la parte madura de los brotes (aproximadamente 15 cm en cada brote). Este muestreo se realizó antes de aplicar los inóculos de hongos y 30 días después de aplicados.

c) Diseño del experimento. Para el bioensayo se estableció un experimento completamente al azar con 6 tratamientos incluyendo el testigo y el testigo absoluto. Se evaluaron cuatro cepas de *H. citriformis*: IB-Hir-2, INIFAP-Hir-4, INIFAP-Hir-2 e IB-Hir-1. Se usaron 24 brotes para cada tratamiento. Se seleccionaron brotes libres de enemigos naturales de *D. citri* y se les infestó con 15 a 20 adultos.

d) Inóculo. El inóculo se preparó al momento de la aplicación a una concentración de 1×10^7 conidios/mL. Los conidios se resuspendieron en agua destilada estéril; y la suspensión se filtró a través de gasa estéril para evitar la transferencia de partículas que pudieran obstruir la boquilla del aspersor, se añadió goma de acacia al 1 %. La suspensión se aplicó por asperjado en los brotes seleccionados hasta empapar el brote. El testigo se asperjó con agua destilada estéril y goma de acacia al 1 % y el testigo absoluto sin tratamiento. Se embolsaron todos los brotes y después de 24 horas se dejaron libres ocho brotes de cada tratamiento (Figura 11).

Se esparció en dirección Este al huerto, todo el inóculo sobrante de la cepa INIFAP-Hir-2 en los árboles aledaños y en dirección Norte, el inóculo sobrante de la cepa INIFAP-Hir-4.

e) Muestreo. Cinco días después de la aplicación, de cada tratamiento se cortaron los brotes embolsados y se transportaron al laboratorio para su observación y continuar

con el bioensayo. Se separaron los insectos vivos y se colocaron en recipientes plásticos (arena experimental) para continuar el bioensayo (Figura 9). Los insectos muertos detectados fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1 % y lavados con agua destilada estéril, estos se colocaron en cámara húmeda para observar la presencia de micosis. El bioensayo finalizó en el laboratorio después de 24 días de iniciado en campo.

		ESTE									
	1		2		3		4		5		6
	7										
	8										
	9										
NORTE	10										
	11										
	12										

Figura 10. Distribución de árboles muestreados en el huerto (Los números corresponden a la ubicación de los árboles muestreados).



Figura 11. Metodología del bioensayo de campo. Arriba de izquierda a derecha, búsqueda de insectos micosados, selección de los brotes, infestación de los brotes, embolsado. Abajo, preparación del inóculo, aplicación por asperjado, insectos en arena experimental, insectos recuperados muertos y micosados.

Treinta días después de la aplicación de los inóculos, se evaluó la presencia de insectos micosados en los mismos brotes en los cuales se realizó la búsqueda de insectos micosados naturalmente antes de iniciar el bioensayo (12 árboles); se buscaron y colectaron insectos micosados en los puntos en los cuales se esparció los sobrantes de los inóculos de las cepas INIFAP-Hir-2 e INIFAP-Hir-4 (10 árboles en cada uno). Evaluamos la dispersión de las cepas probadas en diferentes puntos de la región citrícola, a 50, 250, 500 y 1000 m en dirección E, SE, W y NW y a 8 Km en dirección NNW y NW (Figura 12). Para evaluar la dispersión de las cepas se contabilizaron insectos vivos y muertos micosados en 6 brotes de 10 árboles en cada punto a evaluar. Se colectaron insectos micosados de los diferentes puntos evaluados y se transportaron al laboratorio para aislar al hongo que los micosaba.

Después de aislar el hongo que micosaba los insectos, se cultivó en diferentes medios de cultivo (PDA, PDAY al 0.5 y 1%) para identificar las cepas que se dispersaron en base a sus características de crecimiento de morfología colonial.

11.1 Análisis estadístico

El porcentaje de mortalidad se determinó en base al número de insectos micosados y/o muertos en los tratamientos y se comparó con la mortalidad del testigo. A los resultados de los tratamientos se les aplicó un análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey al 0.05 (SPSS 17.0). Para obtener las CL_{50} y CL_{90} se utilizó el Programa estadístico Probit (U.S. Applied and Enviromental Health, 1989) con el cual se obtuvieron también otros datos estadísticos.

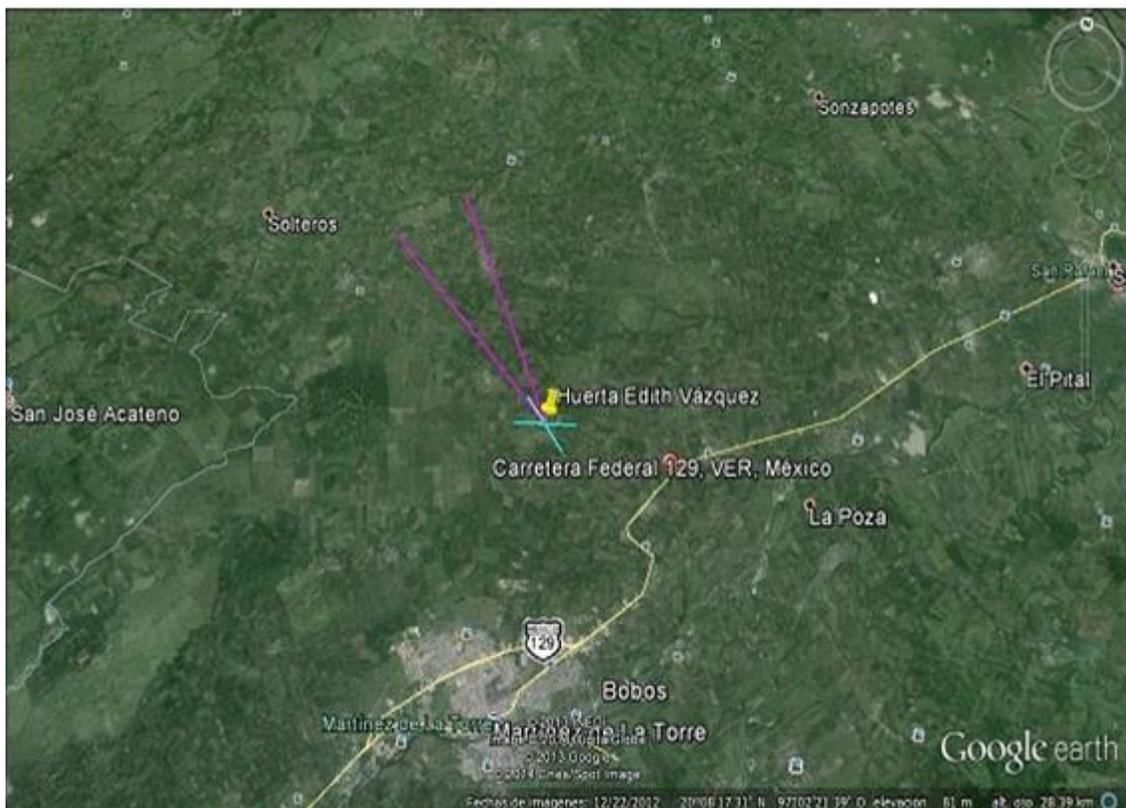


Figura 12. Puntos de muestreo de insectos micosados para determinar la dispersión de las cepas de *Hirsutella* evaluadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Aislamientos

De muestras de insectos micosados de las regiones citrícolas de México de los estados de Veracruz y Colima se lograron aislar dos cepas, que se denominaron IB-Hir-1 e IB-Hir-2, que de acuerdo a sus características morfológicas se identificaron como pertenecientes al género *Hirsutella*.

Se contó además con 6 cepas de *Hirsutella* que fueron aisladas por investigadores del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) que fueron denominadas INIFAP-Hir-1, INIFAP-Hir-2, INIFAP-Hir-4, INIFAP-Hir-5, INIFAP-Hir-6 e INIFAP-Hir-7 provenientes de los estados de Tabasco, Yucatán, San Luis Potosí, Quintana Roo, Campeche y Chiapas respectivamente.

En la Tabla 4 se enlistan los nuevos aislados y las cepas con las que se cuenta para el trabajo de investigación.

Tabla.4 Origen de las cepas monoconidiales del género *Hirsutella* obtenidas de ocho Estados de la República Mexicana.

Cepa	Localidad	Fecha colecta	Hospedero
INIFAP-Hir-1	Huimanguillo, Tabasco	Agosto 2008	Naranja Valencia
INIFAP-Hir-2	Mocochá, Yucatán	Septiembre 2011	Mandarina
INIFAP-Hir-4	Xolol, San Luis Potosí	Octubre 2009	Naranja Valencia
INIFAP-Hir-5	Nuevo Israel, Quintana Roo	Enero 2010	Limonaria
INIFAP-Hir-6	Edzná, Campeche	Septiembre 2011	Limonaria
INIFAP-Hir-7	Tapachula, Chiapas	Diciembre 2011	Limonaria
IB-Hir-1	Ejido la Palmilla, de Tlapacoyan, Veracruz	Septiembre 2011	Limón Persa
IB-Hir-2	Tecomán, Colima	Septiembre 2011	Limón Persa

3. Identificación Morfométrica de *Hirsutella*

Los resultados de los microcultivos realizados muestran una amplia variación en las dimensiones de estructuras de las ocho cepas (Tabla 5). La longitud total de la fiálide varió de 26-42 μm , la base bulbosa de la fiálide de 4.0-8.5 μm y el esterigma de 20.0-38.0 μm . Mientras que las dimensiones del conidio se encuentran entre 5.4-6.3 μm de largo por 1.6-2.0 μm de diámetro. Los conidios rodeados con mucus son de un diámetro entre 5.6-6.2 μm (Figura 13). En las dimensiones de todas las cepas sólo el rango de la longitud del conidio y diámetro del mucus están dentro de la descripción para *H. citriformis* (Mains 1951).

Tabla 5.- Caracterización morfológica de las cepas de *Hirsutella citriformis* Speare. Se realizaron 15 mediciones para las fiálides y 10 mediciones para las otras estructuras, todas las medidas están dadas en micras.

Cepa	Longitud de la fiálide			Conidio		Diámetro del mucus
	Total	Base	Esterigma	Longitud	Diámetro	
INIFAP-Hir-1	37.83±0.50	4.88±0.38	32.95±0.72	5.9±0.089	1.74±0.19	5.99±0.13
INIFAP-Hir-2	36.96±0.09	8.09±.56	28.87±0.12	5.96±0.15	1.96±0.05	5.92±0.08
INIFAP-Hir-4	32.7±0.78	6.1±0.51	26.6±0.78	5.92±0.15	1.43±0.18	5.93±0.08
INIFAP-Hir-5	36.5±0.23	5.08±0.49	31.42±0.19	5.83±0.14	1.84±0.15	5.87±0.14
INIFAP-Hir-6	40.9±0.31	5.1±0.48	35.8±0.40	5.84±0.26	1.94±0.11	5.90±0.13
INIFAP-Hir-7	32.0 ±0.09	5.12±0.23	26.88±0.19	6.04±0.05	1.99±0.03	5.91±0.09
IB-Hir-1	32.09±0.53	5.82±0.26	26.27±0.58	6.11±0.10	1.97±0.05	5.96±0.08
IB-Hir-2	30.7 ±0.46	6.0±0.48	24.7±0.84	5.91±0.14	1.79±0.03	5.86±0.13

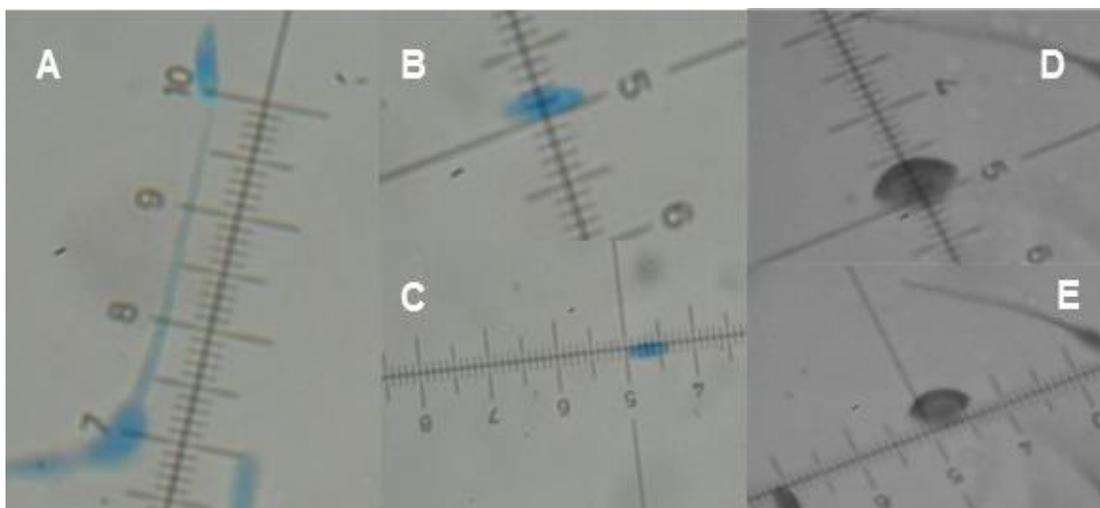


Figura 13. Características morfológicas de las cepas de *Hirsutella* estudiadas: (A) longitud de la fiálide, (B) Anchura del conidio, (C) Longitud del conidio, (D) Anchura del conidio con envoltura mucilaginosa y (E) Longitud del conidio con la envoltura mucilaginosa.

La más amplia descripción de *H. citrifomis* es la que presenta Mains (1951), y ésta es la única especie de *Hirsutella* reportada en *D. citri* (Hall *et al.* 2012; Casique-Valdes *et al.* 2011; Meyer *et al.* 2007; Subandiyah *et al.* 2000). Entonces probablemente las cepas aisladas corresponderían a la especie de *H. citrifomis*, sin embargo esto después se confirmaría con el análisis molecular. Las dimensiones de la fiálide y diámetro del conidio de esta especie (Mains 1951) carecen de concordancia con las dimensiones determinadas en las cepas de *Hirsutella* aisladas de *D. citri* en México. Además, las dimensiones de estructuras de reproducción de *H. citrifomis* obtenidas directamente del hospedero (Meyer *et al.* 2007; Alvarez *et al.* 2003; Hywel-Jones 1997) o de estructuras reproductivas desarrolladas en medio de cultivo (Casique-Valdes *et al.* 2011; Subandiyah *et al.* 2000), tampoco concuerdan con las descritas de la especie. Previamente se ha observado (Mains 1951) que las dimensiones de los sinemas de *H. citrifomis* sobre sus hospederos es variable y que esto puede deberse al tamaño de los insectos en donde se desarrollan. Se esperaba que las dimensiones de estructuras reproductivas de las cepas de *Hirsutella* bajo estudio fueran más similares entre sí al desarrollarse en medios de cultivo; sin embargo, los resultados obtenidos y reportes previos demuestran la gran variabilidad de este hongo (Tabla 6).

Las 8 cepas de *H. citriformis* evaluadas crecieron lentamente en todos los medios de agar, este crecimiento es típico y conforme a los resultados reportados por otros investigadores (Subandiyah *et al.* 2000; Meyer *et al.* 2007; Casique-Valdes *et al.* 2011). Otras características de las colonias, como la apariencia de las colonias fúngicas, la producción de conidias, de sinemas y de exudados variaron dependiendo del medio en el cual se cultivaron (Tabla 7). En cuanto a su morfología de colonia, algunas cepas tuvieron un desarrollo aplanado, no elevado y con poco crecimiento micelial aéreo; la coloración varió de blanco, amarillo, café claro a grisáceo (Figura 14). Algunas con crecimiento micelial cercano al trozo de siembra y con zonas de desarrollo levaduriforme o micelio escaso al acercarse a los bordes de la colonia. La presencia de sinemas fue variable así como la producción de exudados para las 8 cepas; estos resultados de variabilidad, tanto en la morfología, color, presencia de sinemas y exudados que presentan los aislados en los diferentes medios, son reportados también para aislados de cepas de *H. thompsonii* (Chandrapatya *et al.* 1989; Rosas-Acevedo *et al.* 2006).

4. Cultivo en medios comerciales de agar.

resultados de variabilidad, tanto en la morfología, color, presencia de sinemas y exudados que presentan los aislados en los diferentes medios, son reportados también para aislados de cepas de *H. thompsonii* (Chandrapatya *et al.* 1989; Rosas-Acevedo *et al.* 2006).

Tabla 6. Dimensión (μm) de estructuras de cepas de *Hirsutella* aisladas de *D. citri* de México y su comparación con la descripción de *H. citriformis* Mains, (1951) y de otros autores.

Cepa (Fuente)*	Longitud fiálide			Conidio		Diámetro mucus
	Total	Base	Esterigma	Largo	Diámetro	
INIFAP-Hir-1/Tabasco (M)	37.0-38.5	4.7-6.0	31.8-33.8	5.8-6.0	1.6-1.8	5.8-6.2
INIFAP-Hir-2/Yucatán (M)	36.0-37.0	6.5-8.5	26.0-29.0	5.6-6.2	1.8-2.0	5.8-6.0
INIFAP-Hir-4/SLP (M)	32.0-34.0	5.5-7.07	24.0-27.0	5.6-6.1	1.7-1.9	5.7-6.1
INIFAP-Hir-5%Q. Roo (M)	34.0-40.0	4.0-6.0	29.0-34.0	5.4-6.0	1.8-2.1	5.6-6.0
INIFAP-Hir-6/Campeche (M)	39.0-42.0	4.0-6.2	33.0-38.0	5.8-6.0	1.8-2.0	5.6-6.0
INIFAP-Hir-7/Chiapas (M)	31.0-32.0	5.0-5.5	26.5-27.0	6.0-6.1	1.9-2.0	5.8-6.0
IB-Hir-1/Veracruz (M)	31.8-32.8	5.3-6.2	25.6-27.5	6.0-6.3	1.9-2.0	5.8-6.0
IB-Hir-2/Colima (M)	26.0-31.2	4.0-7.0	20.0-25.0	5.7-6.2	1.7-1.9	5.6-6.0
Spear 1920 (H)				5.5-8.5	1.5-1.8	
Mains 1951 (H)	36.0-54.0	6.0-14.0	30.0-40.0	5.0-8.0	2.0-2.5	5.0-10.0
Hywel-Jones 1997 (H)	18.5-52.0			3.5-5.0	1.0-1.5	
Alvarez <i>et al.</i> 2003 (H)			16.8-23.6	6.8-9.1	1.5-2.3	
Meyer <i>et al.</i> 2007 (H)			17.5 \pm 1.9	5.9 \pm 0.8	2.6 \pm 0.3	
Toledo <i>et al.</i> 2013 (H)	35.6-55.4		28.7-47.5	5.9-7.9	2.0-3.0	
Toledo <i>et al.</i> 2013 (H)	22.4-34.7		16.8-28.0	5.6-7.8	2.2-2.8	
Subandiyah <i>et al.</i> 2000 (M)	27.5-62.3	5.1-9.4	22.4-52.9	6.4-7.6	2.1-2.8	
Casique-Valdes <i>et al.</i> 2011 (M)				6.8-7.0	1.5-2.0	

* (M): medio de cultivo); (H): hospedero.

Figura 14. Características de crecimiento colonial de *H. citriformis*. Afelpado escaso (1), afelpado regular (2), afelpado abundante (3) aplanado escaso (4), aplanado regular (5), aplanado abundante (6) aplanado a afelpado escaso (7), aplanado a afelpado regular (8) y aplanado a afelpado abundante (9).Tabla.

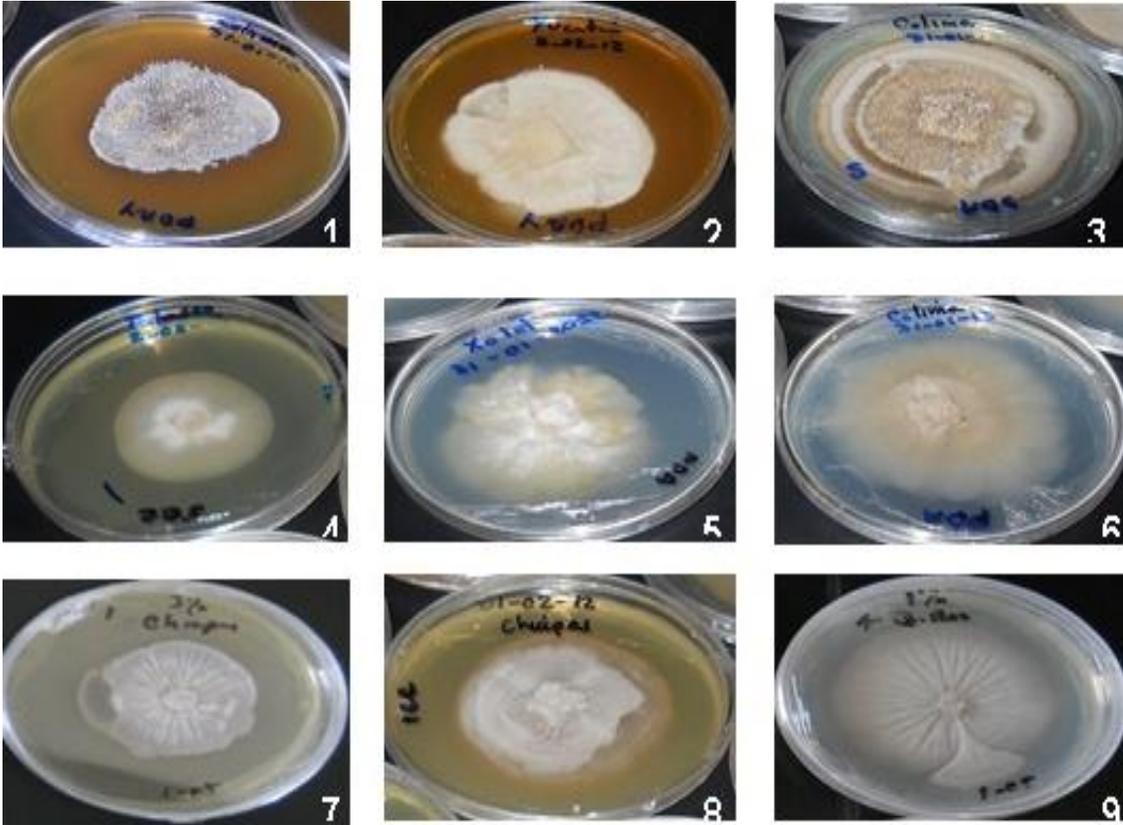
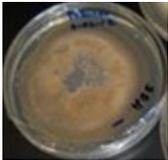
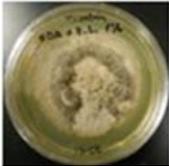
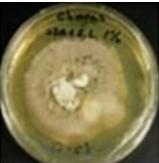


Tabla 7. Caracterización morfológica macroscópica de los aislados de *Hirsutella citriformis* en medios de agar.

cepas	medio de cultivo	color	elevación	crecimiento	exudados		presencia de sinemas	
					amarillo claro	transparente		
IB-Hir-2	PDA	café claro	aplanado	abundante	si	si	si	
COLIMA	PDAY 0.5 %	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si	
	PDAY 1 %	café a gris	afelpado	regular	si	si	si	
		PDAY 2%	café a gris	afelpado	regular	si	si	si
	PDAY 3%	café a gris	afelpado	escaso	si	si	si	
	PDAY 5%	café a gris	afelpado	escaso	si	si	si	
	SDA	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si	
	SDA 0.5%	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si	
	SDA 1%	café a gris	afelpado	regular	si	si	si	
	EM	blanco a gris	afelpado a aplanado	regular	no	no	si	
	EMYP	gris	afelpado	escaso	si	si	si	
INIFAP-Hir-1	PDA	café oscuro	aplanado	regular	no	no	si	
TABASCO	PDAY 0.5 %	café a gris	afelpado	abundante	si	no	si	
	PDAY 1 %	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si	
		PDAY 2%	café a gris	afelpado	regular	si	si	si
	PDAY 3%	café a gris	afelpado	regular	no	no	si	
	PDAY 5%	café a gris	afelpado	escaso	si	no	si	
	SDA	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si	
	SDA 0.5%	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si	
	SDA 1%	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si	
	EM	café amarillento	afelpado a aplanado	abundante	no	no	si	
	EMYP	café claro	aplanado	escaso	si	si	si	
INIFAP-Hir-2	PDA	café amarillento	aplanado	abundante	si	no	si	
YUCATÁN	PDAY 0.5 %	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si	
	PDAY 1 %	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si	
		PDAY 2%	café a gris	afelpado	regular	si	si	si
	PDAY 3%	café a gris	afelpado	escaso	si	no	si	
	PDAY 5%	café a gris	afelpado	escaso	si	si	si	
	SDA	blanco a gris	afelpado	abundante	si	si	si	
	SDA 0.5%	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si	
	SDA 1%	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si	
	EM	café amarillento	afelpado a aplanado	escaso	si	no	si	
	EMYP	café a gris	afelpado	regular	si	si	si	

IB-Hir-1	PDA	blanco a gris	afelpado	abundante	si	si	si
Cepas	medios	color	elevación	crecimiento	exudados		sinemas
VERACRUZ 	PDAY 0.5 %	blanco a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	PDAY 1 %	blanco a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	PDAY 2%	blanco a gris	afelpado	regular	si	si	si
	PDAY 3%	blanco a gris	afelpado	regular	si	si	si
	PDAY 5%	blanco a gris	afelpado	escaso	si	si	si
	SDA	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	SDA 0.5%	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	SDA 1%	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	EM	café amarillento	afelpado a aplanado	abundante	no	si	si
	EMYP	café amarillento	afelpado	regular	si	no	no
INIFAP-Hir-4 SAN LUIS POTOSÍ 	PDA	café a amarillo	aplanado	abundante	no	no	no
	PDAY 0.5 %	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	PDAY 1 %	blanco a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	PDAY 2%	blanco a gris	afelpado	abundante	si	si	no
	PDAY 3%	blanco a gris	afelpado	abundante	si	si	no
	PDAY 5%	blanco a gris	afelpado	abundante	si	si	no
	SDA	café a amarillo	afelpado	abundante	si	si	si
	SDA 0.5%	café a amarillo	afelpado	abundante	si	si	si
	SDA 1%	café a amarillo	afelpado	abundante	si	si	si
	EM	blanco a gris	afelpado a aplanado	regular	no	si	si
EMYP	blanco a gris	afelpado	regular	no	si	no	
INIFAP-Hir-5 QUINTANA ROO 	PDA	café claro	aplanado	abundante	no	no	no
	PDAY 0.5 %	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	PDAY 1 %	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	PDAY 2%	café a gris	afelpado	regular	si	si	si
	PDAY 3%	café a gris	afelpado	regular	si	si	si
	PDAY 5%	café a gris	afelpado	escaso	si	si	si
	SDA	café claro	afelpado	abundante	si	si	si
	SDA 0.5%	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	SDA 1%	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	EM	café amarillento	afelpado a aplanado	abundante	no	si	no
EMYP	café grisáceo	aplanado	escaso	si	no	no	
INIFAP-Hir-7 CHIAPAS 	PDA	blanco a gris	aplanado	abundante	si	no	si
	PDAY 0.5 %	blanco a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	PDAY 1 %	blanco a gris	afelpado	regular	si	si	si
	PDAY 2%	blanco a gris	afelpado	regular	si	si	si
	PDAY 3%	café a gris	afelpado	escaso	si	si	si

	PDAY 5%	café a gris	afelpado	escaso	si	si	si
Cepas	medios	color	elevación	crecimiento	exudados		sinemas
	SDA	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	SDA 0.5%	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	SDA 1%	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	EM	café amarillento	afelpado a aplanado	abundante	no	si	no
	EMYP	café a gris	afelpado	escaso	si	si	si
INIFAP-Hir-6	PDA	blanco a gris	aplanado	abundante	si	no	si
CAMPECHE	PDAY 0.5 %	blanco a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	PDAY 1 %	blanco a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	PDAY 2%	blanco a gris	afelpado	regular	si	si	si
	PDAY 3%	café a gris	afelpado	escaso	si	no	si
	PDAY 5%	café a gris	afelpado	escaso	si	si	si
	SDA	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	SDA 0.5%	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	SDA 1%	café a gris	afelpado	abundante	si	si	si
	EM	café amarillento	afelpado a aplanado	abundante	si	si	no
	EMYP	café a gris	afelpado	escaso	si	si	si



4.1 Efecto de la temperatura en el crecimiento radial

Los resultados del efecto de la temperatura en el crecimiento radial obtenido para los ocho aislados de *H. citriformis* cultivados en 4 diferentes temperaturas y 3 tipos de medios de cultivo en agar, se muestran en la Tabla 8 en la cual es posible apreciar que las cepas en general presentan mayor crecimiento en el medio PDAY al 0.5 % y a 25 °C en contraste al menor crecimiento a 30 °C en los tres medios de cultivo. El análisis de varianza multifactorial realizado a los resultados, seguido de diferenciación de medias mediante Tukey, al 0.05 de valor de significancia, mostró diferencias significativas entre cada una de las cepas estudiadas ($F = 424.219$; $gl = 7, 384$; $P < 0.001$), así como entre medios ($F = 424.219$; $gl = 2, 384$; $P < 0.001$) y temperatura de incubación ($F = 14106.823$; $gl = 3, 384$; $P < 0.001$). El mayor valor promedio de crecimiento radial fue de $0.245 \text{ cm}\cdot\text{día}^{-1}$ para la cepa IB-Hir-2 obtenido en el medio PDA con extracto de levadura al 0.5 % (PDAY) y la temperatura a la cual se obtuvo significativamente el mayor crecimiento fue 25°C, mientras que el menor crecimiento radial significativo fue de $0.036 \text{ cm}\cdot\text{día}^{-1}$ conjuntamente para la cepa IB-Hir-1, cultivada en los medios de PDA

y SDA a la temperatura de incubación de 30 °C y la cepa INIFAP-Hir-4 cultivada en SDA también a 30 °C.

Se encontró también diferencia significativa en las interacciones cepas-medios, (F= 55.347; gl = 7,14; P= <0.001) cepas temperaturas, (F= 111.315; gl = 7,21; P= <0.001) temperaturas-medios, (F= 87.464; gl = 3,6; P= <0.001) y en la interacción de los tres factores (cepa-medios-temperaturas) (F= 23.702; gl = 7, 3,42; P= <0.001). El mayor crecimiento radial lo presentaron todos los aislados en el medio PDAY a 25 °C de temperatura de incubación.

Tabla 8. Crecimiento radial (mm) de cepas de *Hirsutella citriformis* presentado a 4 diferentes temperaturas y 3 diferentes medios de cultivo.

CEPAS	21 °C			25°C			28°C			30°C		
	PDA	PDAY	SDA									
INIFAP-Hir-1	0.214 cd	0.24 a	0.229 bc	0.242 a	0.24 a	0.216 cd	0.153 i	0.174 gh	0.17h	0.08 no	0.1 m	0.102m
INIFAP-Hir-2	0.157 i	0.21 d	0.137 jk	0.226 bc	0.24 a	0.173 gh	0.186 f	0.206 de	0.137 jk	0.04 qr	0.087 n	0.041 qr
INIFAP-Hir-4	0.219 c	0.218 c	0.207 d	0.229 bc	0.237 ab	0.194ef	0.194 ef	0.213cd	0.152 ij	0.055 pq	0.061 p	0.036 r
INIFAP-Hir-5	0.141 j	0.188 ef	0.132 k	0.182 f	0.242 a	0.178 g	0.114 l	0.168 h	0.096m	0.065 p	0.078 no	0.038 r
INIFAP-Hir-6	0.124 kl	0.143 j	0.147 ij	0.174 gh	0.234 b	0.167 h	0.149 ij	0.212 d	0.151 ij	0.138 jk	0.047 q	0.039 r
INIFAP-Hir-7	0.18 g	0.214 cd	0.174 gh	0.215 cd	0.235 b	0.178 g	0.204 de	0.221 bc	0.152 ij	0.07 op	0.076 o	0.054 pq
IB-Hir-1	0.179 g	0.19 ef	0.144 j	0.18 g	0.241 a	0.175 gh	0.155 i	0.226 bc	0.164 hi	0.036 r	0.038 r	0.036 r
IB-Hir-2	0.198 e	0.202 de	0.212 d	0.209 d	0.245 a	0.201 e	0.203 de	0.223 bc	0.153 i	0.069 op	0.09 n	0.038 r

Estos resultados difieren con los obtenidos por Chandrapatya *et al* (1989) los cuales reportan que *H. thompsonii* var. *Synnematosa* tiene el máximo crecimiento radial a 26 °C en los medios SDA y Extracto de Malta pero en los medios PDA y V8 el máximo crecimiento radial se obtiene a 32 °C.

4.2 Evaluación del crecimiento radial en 11 diferentes medios comerciales de agar.

Los resultados en el crecimiento radial obtenido para los 8 aislados en los diferentes tipos de agar se muestran en la Tabla 9. El menor diámetro de crecimiento radial a los 34 días de incubación fue de 1.66 cm para la cepa IB-Hir-2 en los medios de cultivo PDAY al 5% y el medio EMAYP; mientras que el mayor valor promedio de diámetro de crecimiento fue de 3.8 cm para la cepa INIFAP-Hir-6 en el medio PDAY al 0.5%. El análisis de varianza mostró diferencia significativa en el crecimiento de las cepas en los medios de agar probados ($F= 630.87$; $gl=10, 32$; $P= < 0.001$), así como también entre las cepas ($F= 159.51$; $gl=7, 23$; $P= < 0.001$). Todas las cepas tuvieron mayor crecimiento en los medios de PDA y SDA enriquecidos con extracto de levadura al 0.5 y 1 % (Figura 15). Aunque las cepas presentaron un crecimiento lento, éste en siete de nuestras cepas es mayor al reportado por Meyer *et al.* (2007) en el medio de SDAY al 1 % quienes reportan un crecimiento diario de 0.083 cm. El crecimiento de las ocho cepas en el mismo medio varió de 0.0795 cm día⁻¹ (IB-Hir-2) a 0.105 cm día⁻¹ (INIFAP-Hir-4).

Tabla.9 Crecimiento radial (en cm) de cepas de *H. citriformis* en 11 medios de cultivo incubadas a 25°C.

CEPAS	PDA	PDAY 0.5%	PDAY 1%	PDAY 2%	PDAY3%	PDAY 5%	SDA	SDA 0.5%	SDA 1%	EM	EMYP
INIFAP-Hir-1	5.82 EFc	7.1 Aabc	6.94 ABb	5.6 Fb	4.62 Gbc	3.64 Hbc	6.5 CDbc	6.54 BCb	6.78 ABCb	6.1 DEc	3.46 Hcd
INIFAP-Hir-2	6.24 ABCab	7.22 ABabc	6.96 Ab	5.84 Cb	4.06 Dc	4.04 Db	6.24 ABCc	6.8 ABb	6.46 ABCcd	6.2 BCbc	4.22 Db
INIFAP-Hir-4	6 BCbc	7.48 Aa	7.58 Aa	7.1 Aa	6.12 BCa	6.36 Ba	6.3 Bbc	7.16 Aa	7.14 Aa	5.74 Cd	5.68 Ca
INIFAP-Hir-5	6.5 Ca	7.28 Aab	7.04 ABab	5.88 Db	4.72 Eb	4.08 Fb	6.44 Cbc	7.36 Aa	6.58 BCbc	6.46 Cab	3.92 Fbc
INIFAP-Hir-6	6.28 Dab	7.6 Aa	6.9 BCb	4.88 Ec	4.32 Fbc	4.14 Fb	6.5 CDbc	7.14 ABa	6.18 Dde	6.5 CDab	3.48 Ged
INIFAP-Hir-7	6.24 BCab	6.5 ABbc	5.16 Dc	4.58 DEcd	4.44 Ebc	3.66 Fbc	6.72 ABab	7.18 Aa	6.04 Ce	6.42 BCab	3.76 Fbcd
IB-Hir-1	6.28 BCab	6.82 Aabc	6.88 Ab	5.66 Deb	5.94 CDa	4.14 Eb	7.06 Aa	6.72 ABb	6.02 CDe	6.64 ABa	5.86 CDa
IB-Hir-2	6.26 ABab	6.4 Ac	5.7 BCc	4.26 Dd	3.48 Ed	3.32 Ec	6.48 Abc	6.12 ABc	5.42 Cf	5.36 Ce	3.32 Ed

Las medias seguidas por la misma letra no tienen diferencia significativa (ANOVA bifactorial (Tukey al 0.05). Letras mayúsculas corresponden a la comparación entre medios de cultivo de una misma cepa y letras minúsculas a la comparación entre cepas en un solo medio de cultivo.

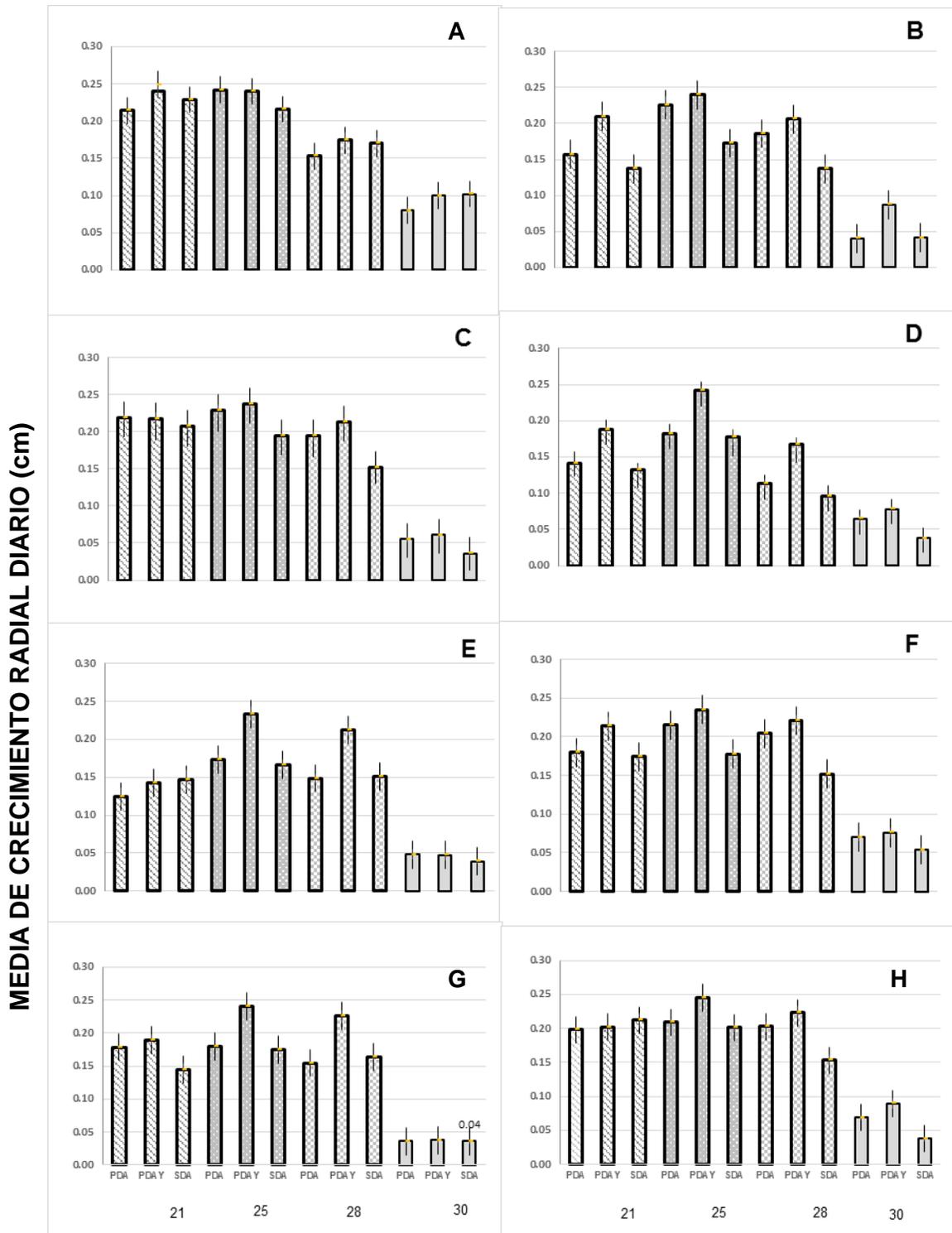


Figura 15. Crecimiento de *Hirsutella citriformis* en 3 medios de cultivo e incubadas a 4 diferentes temperaturas. Las letras corresponden a las cepas A, INIFAP-Hir-1; B, INIFAP-Hir-2; C, INIFAP-Hir-4; D, INIFAP-Hir-5; E, INIFAP-Hir-6; F, INIFAP-Hir-7; G, IB-Hir-1; H, IB-Hir-2.

4.3 Evaluación de la producción de conidios

La media del número de conidios producido en los diferentes medios varió de 1.22×10^6 a 2.79×10^7 conidios/mL donde el valor mínimo correspondió a la cepa INIFAP-Hir-2 en el medio PDA y el valor máximo a la cepa IB-Hir-2 en el medio de PDAY al 1% (Tabla 10). De acuerdo al análisis estadístico y comparación de medias usando el método de Tukey al 0.05 de valor de significancia, hubo diferencia significativa en la producción de conidias/mL entre los 11 medios ($F= 615.73$; $gl=10, 32$; $P = < 0.001$). También se observó diferencia significativa en la producción de conidias entre las 8 cepas ($F= 753.53$; $gl=7, 23$; $P = < 0.001$). Estos serían los primeros reportes de conidiación de este hongo, ya que solamente es mencionada la pobre conidiación que se obtiene con este hongo, por otros investigadores.

5. Cultivo en medios líquidos

A *H. thompsonii* se le ha cultivado obteniendo buenos resultados de producción de blastosporas en cultivo líquido, por lo cual nosotros usamos preliminarmente un método de cultivo en el cual se realiza un pre-cultivo para usarse como pre-inóculo de 1 semana en medio de casaminoácidos y de este cultivo se toma un 10 % para inocular los medios a probar. Realizamos esta técnica y nos encontramos que *Hirsutella citrifomis* produce una gran cantidad de sustancias, probablemente exopolisacáridos los cuales gelatinizan el medio de cultivo. Por esta razón optamos por no desarrollar un pre-inóculo y cultivarlos directamente inoculando los matraces con 4 trozos de 1 cm cuadrado de cultivos de dos semanas.

La media del número de blastosporas producidas en los medios varió de 4.3×10^8 a 3.8×10^5 blastosporas/mL donde el valor mínimo correspondió a la cepa IB-Hir-1 en el medio PDB y el valor máximo a la cepa INIFAP-Hir-1 en el medio de Casaminoácidos (días 7 y 9 de fermentación respectivamente) (Tabla 11). De acuerdo al análisis estadístico y comparación de medias de acuerdo al método de Tukey al 0.05 de

valor de significancia hubo diferencia significativa en la producción de blastosporas/mL entre los 8 cepas en el medio de Casaminoácidos ($F= 1668.38$, $gl=7$, 64 , $P= <0.001$). También se mostró diferencia significativa en la producción de blastosporas entre las 8 cepas en el medio PDB ($F= 2144.09$, $gl=7$, 64 , $P= <0.001$). Pudimos observar que las cepas estudiadas se comportan diferente en los dos medios evaluados (Figura 16), algunas produjeron mayor cantidad de blastosporas en el medio de casaminoácidos (INIFAP-Hir-1, INIFAP-Hir-4, INIFAP-Hir-6 e INIFAP-Hir-7) y otras en el medio PDB (INIFAP-Hir-2, IB-Hir-1 e IB-Hir-2). Los resultados obtenidos son mayores que los reportados para producción de blastosporas de la cepa de *Hirsutella* sp. en el mismo medio de casaminoácidos por Romero-Rangel *et al.* (2012) aunque se realizó un método diferente de fermentación, ya que nosotros no realizamos un pre-cultivo como lo realizaron dichos investigadores.

Tabla.10 Números promedio de conidias producidas por cepas de *H. citriformis* en 11 diferentes medios de cultivo (números $\times 10^6$)

CEPAS	PDA	PDAY .5	PDAY 1	PDAY 2 %	PDAY 3%	PDAY 5%	SDA	SDA 0.5%	SDA 1 %	YMA	YMAP
INIFAP- Hir-1	4.833 Fa	8.54 Dd	6.75 Dec	18.97 Aa	2.056 Gd	15.17 Ba	5.33 Efa	4.47 Fab	4.57 Fb	12.166 Cb	7.07 Deb
INIFAP- Hir-2	1.223 Fc	16.333 Ab	3.75 Dde	3.96 Dbc	3.7 Dc	2.16 Ed	1.756 Efd	4.48 Da	2.53 Ede	6.533 Bcd	5.383 Cc
INIFAP- Hir-4	1.8 Efc	1.49 Ff	2.7 Cde	3.15 BCcd	3.816 Bc	2.15 DEFd	2.8 CDc	2.84 CDde	7.417 Aa	6.8 Acd	2.383 CDEd
INIFAP- Hir-5	1.692 FGc	1.486 Gf	5.46 Ccd	5.07 Cdb	6.9 Bb	3.76 DEc	2.276 FGcd	3.85 DEabc	2.85 EFcd	17 Aa	4.47 CDc
INIFAP- Hir-6	1.59 Ec	5.446 Be	6.92 Ac	5.35 Bb	3.216 Cc	1.58 Ed	1.69 Ed	1.95 DEF	1.67 Ee	5.706 Bd	2.643 CDd
INIFAP- Hir-7	3.616 Eb	13.233 Ac	9.18 Bb	3.15 Efc	6.35 Cb	1.91 Hd	2.926 EFGc	2.42 FGHef	2.27 FGHde	5.433 Dd	2.2 GHd
IB-Hir-1	1.806 Dc	5.317 Be	2.67 Cde	2.96 CDcd	3.7 Cc	7.27 Ab	2.6 CDc	3.28 Ccd	3.13 Ccd	6.466 ABcd	2.533 CDd
IB-Hir-2	4.266 Eab	18.333 Ba	27.9 Aa	1.72 Bd	11.433 Ca	6.8 Db	4.46 Eb	3.62 Ebcd	3.75 Ebc	7.716 Dc	8.483 Da

Las medias seguidas por la misma letra no tienen diferencia significativa (Tukey al 0.05). Letras mayúsculas corresponden a la comparación entre medios de cultivo de una misma cepa y letras minúsculas a la comparación entre cepas en un solo medio de cultivo.

Tabla. 11 Promedio del número de blastosporas/mL producidas por ocho cepas de *Hirsutella citriformis* en Medio de Casaminoácidos (CA) y caldo papa dextrosa (PDB) incubados en agitación a 250 rpm y $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 14 días. (números $\times 10^5$)

CEPAS	CASAMINOACIDOS				CALDO PAPA DEXTROSA			
	DÍA 7	DÍA 9	DÍA 11	DÍA 14	DÍA 7	DÍA 9	DÍA 11	DÍA 14
INIFAP-1	161 Da	4300 Aa	2600 Ba	2433 Ca	24.33 Aab	146 Bb	1286 Ca	853 Da
INIFAP-2	25.5 Aa	25.9 Ac	28 Ac	14.5 Ab	5 Bb	13 Bc	54 Ac	10 Ab
INIFAP-4	19 Aa	211 Ab	234 Abb	72 Bb	16 Ab	13 Ac	17 Acd	13 Ab
INIFAP-5	11 Aa	24.5 Ac	131 Abc	73 Ab	7 Ab	16 Ac	11 Ad	9 Ab
INIFAP-6	7.6 Aa	8.79 Ac	12.8 Ac	12.17 Ab	6.3 Ab	8.18 Ac	7.24 Ad	8.27 Ab
INIFAP-7	7.4 Aa	19.33 Ac	12 Ac	7.2 Ab	8.67 Ab	13.5 Ac	12.5 Ad	8.18 Ab
IB-1	17.67 Aa	17.33 Ac	25.73 Ac	16 Ab	3.8 Ab	8.43 Ac	26.33 Acd	9.77 Ab
IB-2	11 Aa	152 Abc	70 Abc	171 Ab	52 Ca	228 Ba	770 Ab	32 Cb

Letras mayúsculas indican diferencia significativa entre las cepas a los 14 días y letras minúsculas a los 21 días (Tukey 0.05).

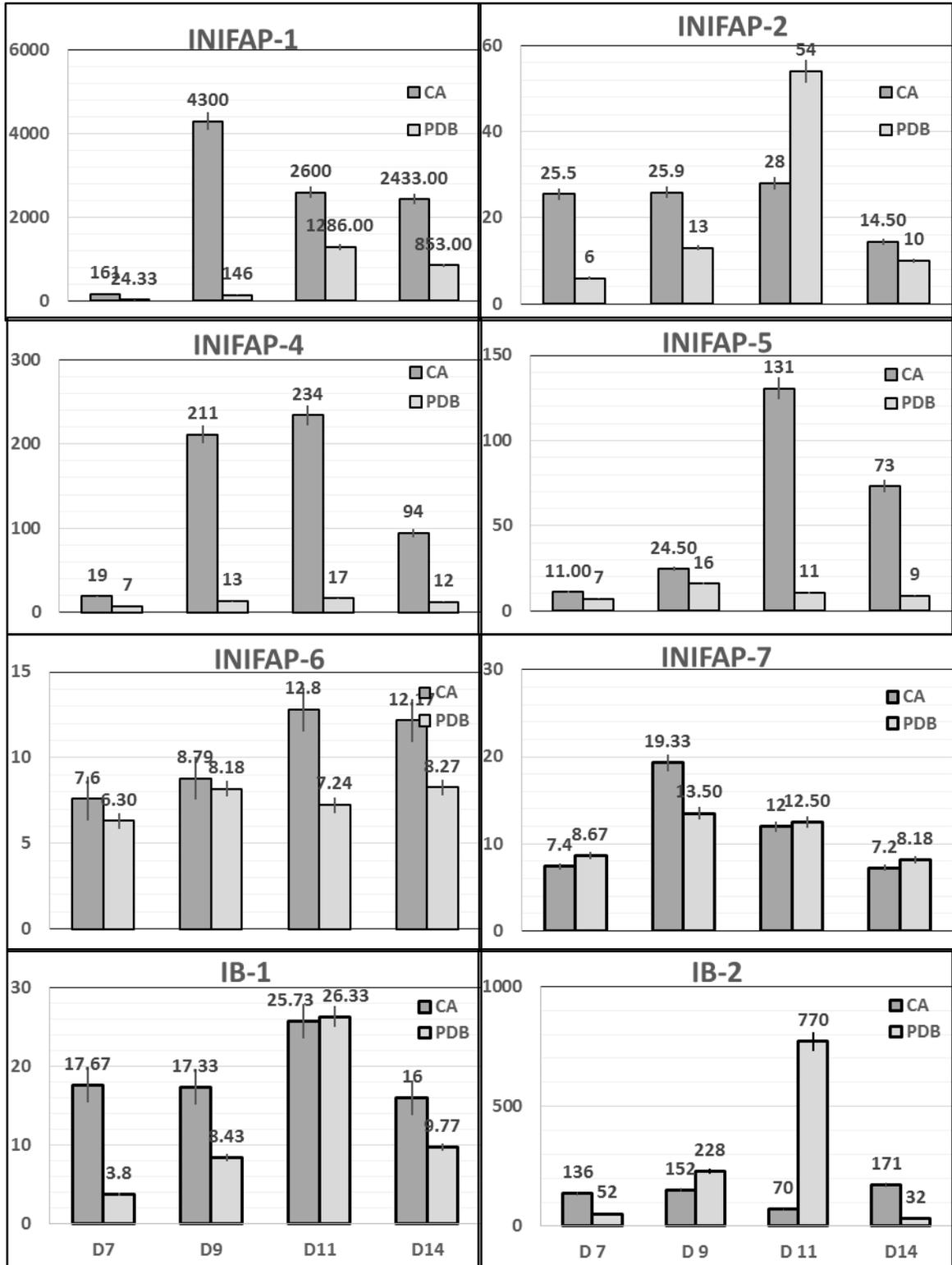


Figura 16. Producción de blastosporas de *Hirsutella citriformis* en los medios de casaminoácidos (CA) y caldo papa dextrosa (PDB), incubadas en agitación a 250 rpm y 25 ± 2 °C.

6. Cultivo en sustratos sólidos

Esto fue realizado en el medio de arroz, donde se obtuvieron los resultados siguientes: la media del número de conidios producidos en el medio varió de 19.73 a 6.3 x 10⁶ conidios/g \mp donde el valor mínimo correspondió a la cepa IB-Hir-1 a los 21 días de incubación y el valor máximo a la cepa INIFAP-Hir-4 a los 14 días de incubación. De acuerdo al análisis estadístico y comparación de medias (método de Tukey al 0.05 de valor de significancia) hubo diferencia significativa en la producción de conidios/g \mp entre las ocho cepas a los 14 días (F= 74.9075; gl=7, 16; P= <0.001). También se observó diferencia significativa en la producción de conidios entre las 8 cepas a los 21 días (F= 39.23, gl= 7, 16; P= < 0.001). Pudimos notar que las cepas evaluadas presentaron su mayor producción de conidios a los 14 días (Figura 17), y después de este día los conidios se desprenden y disminuye la cantidad presente en el cultivo.

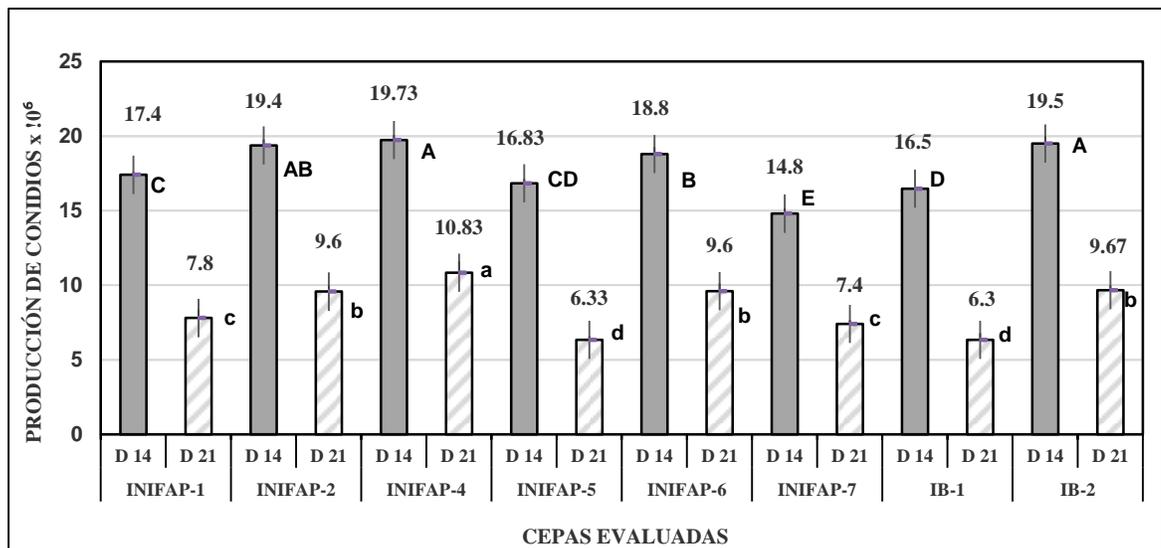


Figura 17. Producción de conidios de *Hirsutella citriformis* en el sustrato vegetal de arroz. Letras mayúsculas indican diferencia significativa entre las cepas a los 14 días y letras minúsculas a los 21 días (Tukey 0.05).

Nuestros resultados son menores que los reportados por Reyes-Martínez *et al.* (2010) los cuales cultivaron a *H. citriformis* en trigo por 3 semanas y obtuvieron una conidiación de 7.6 x 10⁷ conidios/g de sustrato colonizado, pero la conidiación de

nosotros ocurre en menor tiempo que la reportada por Meyer *et al.* (2007) los cuales reportan obtener abundantes sinemas en sustrato de arroz a las seis semanas y Reyes-Martínez *et al.* (2010), en trigo a las tres semanas.

7. Caracterización de los exudados

7.1 Proteínas

Las ocho cepas de *H. citrifomis* produjeron en su fase de crecimiento, un exudado de color amarillo (Figura 18) que al ser analizado con el método de Bradford (Tabla 12 curva de calibración) resultó ser de tipo proteico (Tabla 13), la cual puede tratarse de la proteína Hirsutellina como se tiene reportada para cepas de *H. thompsonii* (Mazet y Vey 1995; Krasnoff y Gupta 1994; Omoto y McCoy 1998) y que se encuentra caracterizada como Hirsutellina A (Liu *et al.* 1995; Boucias *et al.* 1998). Pudiera tratarse también de Oosporina, reportada su producción por *Hirsutella thompsonii* (Rosas-Acevedo *et al.* 2003) cuya actividad biológica causa una disminución en la producción de huevos de las hembras de ácaros. Además, se ha reportado la producción de hirsutellones en *H. nivea* (Madla *et al.* 2008) con actividad sobre *Mycobacterium tuberculosis*. También está reportada la producción de exudado que se desarrolla formando gotas sobre la superficie de cultivos en agar (Cabrera y López 1977; Samson *et al.* 1980) los cuales son tóxicos para ácaros e insectos.

Tabla.12 Curva de calibración para detección de proteínas

Estandar	Conc. Std.	Absorbancia
0	0 µl	0.000433
1	25 µl	0.125167
2	50 µl	0.253267
3	75 µl	0.344100
4	100 µl	0.459200
5	125 µl	0.553167

Tabla.13 Identificación de proteínas en las cepas de *H. citrifomis*.

CEPAS	ABSORBANCIA
INIFAP-Hir-1	1.49
INIFAP-Hir-2	0.9105
INIFAP-Hir-4	0.4323
INIFAP-Hir-5	0.4354
INIFAP-Hir-6	0.4337
INIFAP-Hir-7	0.5792
IB-Hir-1	0.4966
IB-Hir-2	0.52
G. AMARILLA	0.2803
G,TRANSPARENTE	0.0000



Figura 18. Exudados producidos por las cepas mexicanas de *Hirsutella citriformis* cultivadas en agar. A exudados amarillo y cristalino, B exudado cristalino.

7.2 Exopolisacáridos

Además del exudado de color amarillo, las ocho cepas de *H. citriformis* en su fase de crecimiento vegetativo exudaron una sustancia cristalina (Figura 18) la cual al ser analizada con el método del fenol sulfúrico (curva de calibración en la Tabla 14) dió reacción colorimétrica para carbohidratos (Tabla 15) el cual probablemente es un exopolisacárido, ya que se tienen reportes en los cuales mencionan que *Hirsutella* sp. produce exopolisacáridos formados por manosa, galactosa y glucosa (Li *et al.* 2010) los cuales presentan actividad contra bacterias (G +).

Tabla.14 Curva de calibración para detección de carbohidratos.

Estandar	(mg/mL)	Absorbancia
1	0.000 µl	0.00
2	0.025 µl	0.12
3	0.075 µl	0.31
4	0.100 µl	0.61
5	0.500 µl	1.58
6	1.000 µl	2.66
7	1.500 µl	3.45

Tabla.15 Detección de carbohidratos en ocho cepas de *H. citriformis*.

CEPAS	ABSORBANCIA
INIFAP-Hir-1	0.2995
INIFAP-Hir-2	0.6525
INIFAP-Hir-4	0.1314
INIFAP-Hir-5	1.5989.
INIFAP-Hir-6	0.0042
INIFAP-Hir-7	0.4077
IB-Hir-1	1.5672
IB-Hir-2	2.1514
G. TRANSPARENTE	0.0886
G. AMARILLA	0.0000

8. Caracterización molecular de las cepas de *Hirsutella*

En el GenBank se encontraron secuencias para 30 especies de *Hirsutella*, de estas especies cuatro tienen secuencias del gen ribosomal 18S, 14 del 28S ribosomal y nueve del gen de la β -tubulina, mientras que 19 especies cuentan con secuencias de los ITS1 e ITS2 incluyendo el gen 5.8S (Tabla 16). Con esta información se decidió obtener secuencias del gen 28S e ITSs para establecer la posible identidad de las cepas de *Hirsutella* aisladas de *D. citri* de México. La secuencia consenso de los productos de PCR de las siete cepas mexicanas de *Hirsutella* aisladas de *D. citri*, varió de 864 a 914 pb para el gen 28S y de 522 a 596 para la región ITS-1 e ITS-2. Las secuencias se depositaron en el GenBank con los números de acceso señalados en los filogramas obtenidos.

Tabla.16 Acciones de especies de *Hirsutella* enlistadas en el Genbank y usadas para establecer su relación con cepas mexicanas de *Hirsutella* aisladas de *D. citri*.

No.	Species	ITSs	28S	No.	Species	ITSs	28S
1	<i>H. aphidis</i>	EF194156.1		14	<i>H. nodulosa</i>	EF194146.1	AY518379.1 DQ075675.1
2	<i>H. citriformis</i>	JF906754.1 JF894156.1	AY518376.1 DQ075678.1 EF363707.2 KJ803256.1	15	<i>H. proturicola</i>	AB378557.1	AB378557.1
3	<i>H. gigantea</i>		JX566977.1	16	<i>H. rhossiliensis</i>	EF546655.1	EF546655.1
4	<i>H. gregis</i>	EF194155.1		17	<i>H. rostrata</i>	EF194150.1	
5	<i>H. guyana</i>	DQ345595.1	DQ075676.1	18	<i>H. sinensis</i>	AJ243980.1	
6	<i>H. homalodisca</i>		DQ075674.1	19	<i>H. stilbelliformis</i>		GQ866966.1 GQ866967.1
7	<i>H. huangshanensis</i>	EF689043.1		20	<i>H. strigosa</i>		AY518377.1
8	<i>H. illustris</i>		AY518380.1	21	<i>H. subulata</i>		AY518378.1
9	<i>H. kirchneri</i>	EF194154.1	AY518382.1	22	<i>H. thompsonii</i>	FJ973072.1	DQ075673.1 AY518375.1 AF339528.1
10	<i>H. liboensis</i>	FJ957892.1		23	<i>H. tunicata</i>	JN247824.1	
11	<i>H. longicolla</i>	FJ973071.1		24	<i>H. uncinata</i>	AY365468.1	
12	<i>H. minnesotensis</i>	DQ078757.1		25	<i>H. vermicola</i>	DQ345592.1	
13	<i>H. necatrix</i>		AY518381.1	26	<i>H. versicolor</i>	DQ345594.1	

El análisis realizado con el algoritmo megablast en el NCBI, mostró que las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 de las cepas mexicanas de *Hirsutella*, mostraron la mayor similitud con secuencias del gen 5.8S e ITS2 de *Ophiocordyceps* y *Cordyceps*; mientras que el análisis de las secuencias del gen 28S mostró mayor similitud con *Ophiocordyceps elongata* y *Ophiocordyceps coccidiicola*.

El análisis filogenético con la región ITS1-5.8S-ITS2 de las 19 especies de *Hirsutella* y las cepas mexicanas se realizó con 606 pb, después de alinearse y recortarse con el programa MEGA.

El análisis filogenético de la región ITS1-5.8S-ITS2 mostró que las cepas mexicanas de *Hirsutella* son altamente similares entre sí y forman un nodo en común con secuencias denominadas como *H. citrifomis* en el GenBank (accesiones JF906754 y JF894156) (Figura 19). La variación entre las secuencias de los aislados mexicanos, expresada en número de sustituciones por cada 100 nucleótidos, va de 0.00 a 0.21. La variación entre las secuencias de las especies de *Hirsutella* va de 0.00 (*H. kirchneri* con *H. gregis*) a 28.89 (*H. longicolla* con *H. guyana*). Mientras que la variación entre los aislados mexicanos y la secuencia de *H. citrifomis* es de 15.45 a 15.73. Lo anterior demuestra la escasa relación entre las cepas mexicanas de *Hirsutella* aisladas de *D. citri* y las secuencias de *H. citrifomis* depositadas en el GenBank de *Oliarus dimidiatus* Berg (Hemiptera: Cixiidae) (accesión JF894156) y *Ectopsocus* sp. (Psocodea: Ectopsocidae) (Accesión JF906754).

El análisis filogenético del gen 28S se realizó con 495 pb y mostró que las cepas mexicanas de *Hirsutella* son idénticas entre sí y con dos secuencias de *H. citrifomis* depositadas en el GenBank (accesiones AY518376 y DQ075678) obtenidos a partir de cepas aisladas de *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) (Figura 20). Otras dos secuencias del gen 28S de *H. citrifomis* aisladas de *D. citri* (accesión EF363707) y *O. dimidiatus* (accesión KJ803256), se encuentran separadas de las anteriores y entre ellas mismas. La variación entre las secuencias de las especies de *Hirsutella* fue de 0.62 % en una taxa estrechamente relacionada (es decir *H. illustris* con *H. rhossiliensis*) a 9.62 %

en taxa desigual (es decir *H. guyana* con *H. kirchneri*). El análisis filogenético de la secuencia del gen 28S demostró que las cepas mexicanas de *Hirsutella* están fuertemente relacionadas a *H. citriformis*.

El análisis BLAST mostró que las del gen ITS1-5.8S-ITS2, y del gen 28S del DNAr de las cepas mexicanas de *Hirsutella* están relacionadas con especies del género *Ophiocordyceps*; estos resultados eran esperados porque *Hirsutella* es considerada el estado anomorfo del estado telomorfo de *Ophiocordyceps* (Evans *et al.* 2011; Seifert y Boulay 2004; Mains 1951). Debido a la escasa relación del ITS1 con géneros de entomopatógenos, como se ha observado por Toledo *et al.* (2013) al realizar un análisis BLAST con secuencias ITSs de *Hirsutella* sp., se revisó la presencia del iniciador ITS-1 en las secuencias de las cepas bajo estudio y se confirmó la presencia del iniciador (ancla en el gen 18S ribosomal); lo que indicó que es confiable el resultado obtenido mediante el análisis BLAST con las secuencias de las cepas mexicanas de *Hirsutella*. Se esperaba que las secuencias de las cepas mexicanas del gen 28S en el análisis BLAST tuvieran alta similitud con la secuencia de *H. citriformis* aislada por Meyer *et al.* (2007) de *D. citri* y depositada; y esto fue confirmado.

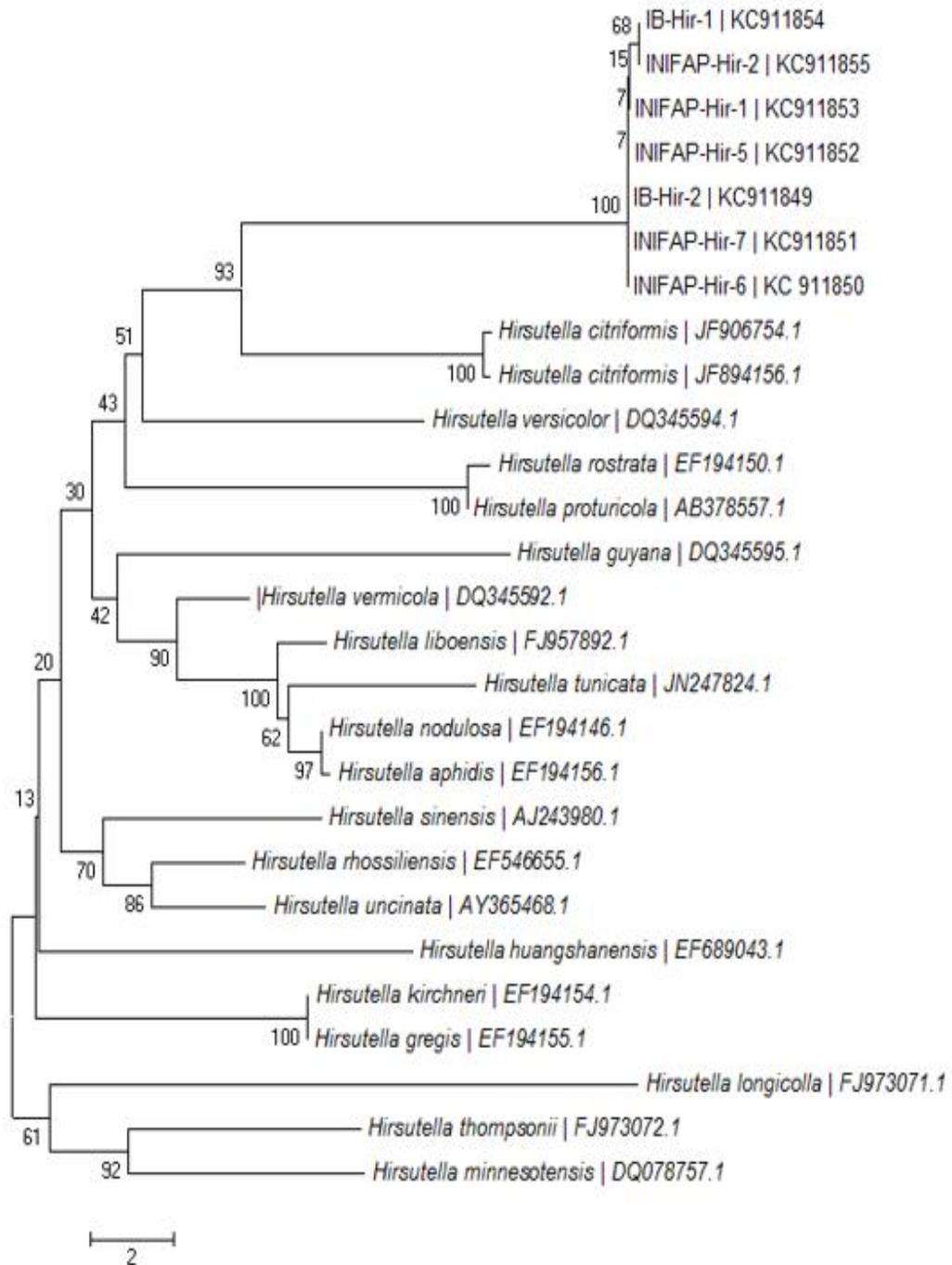


Figura 19. Filograma realizado con secuencia de ITS1-5.8S-ITS2 de 19 especies de *Hirsutella* enlistadas en el NCBI y siete cepas mexicanas de este género aisladas de *D. citri* de México. Los porcentajes del análisis de bootstrap que respaldan la ramificación del árbol se muestran en sus respectivos nodos. La escala representa cantidad de sustituciones por cada 100 nucleótidos.

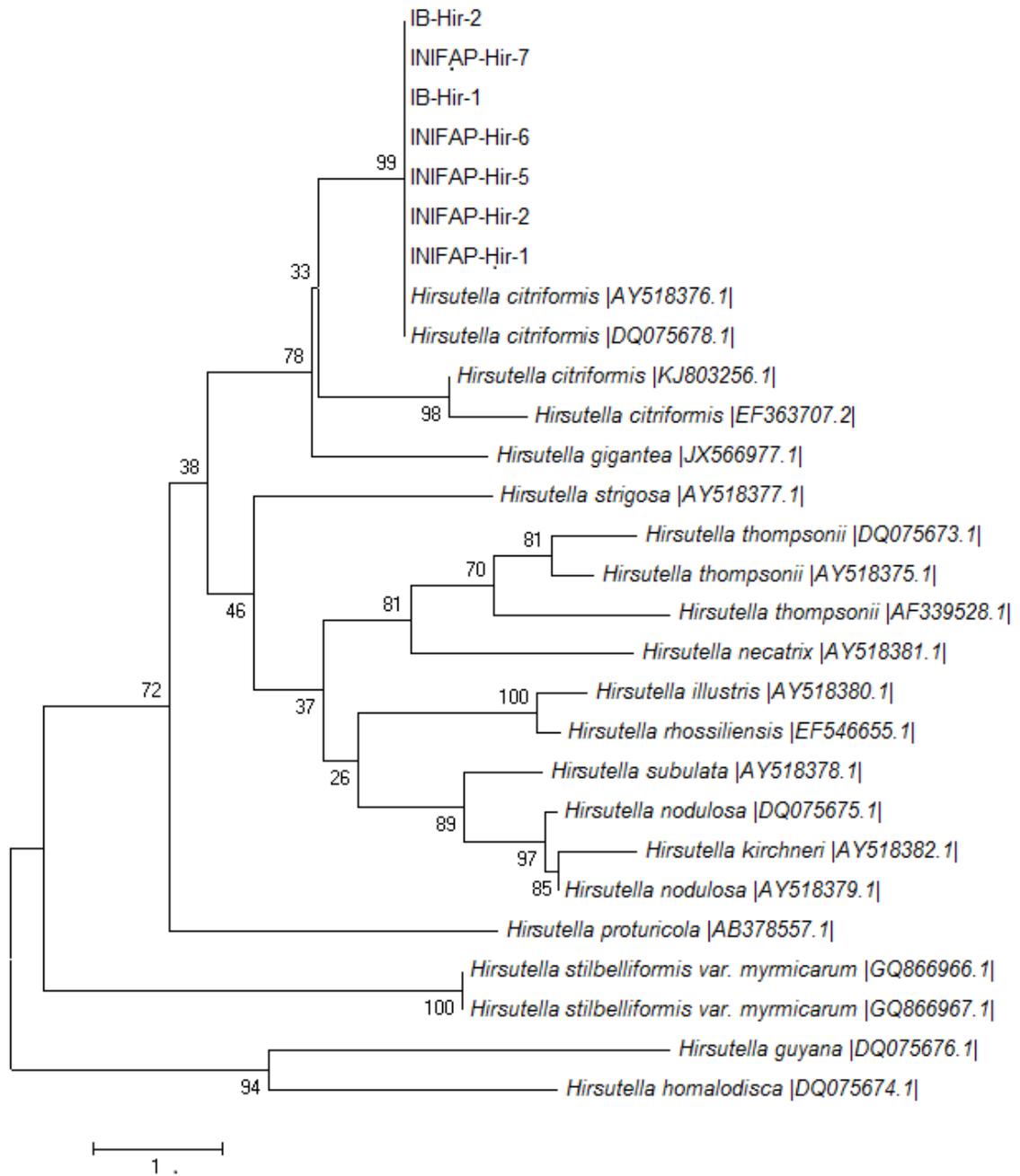


Figura 20. Filograma realizado con secuencias del gen 28S ribosomal de 14 especies de *Hirsutella* enlistadas en el NCBI y siete cepas mexicanas de este género aisladas de *D. citri* de México. Los porcentajes del análisis de bootstrap que respaldan la ramificación del árbol se muestran en sus respectivos nodos. La escala representa la cantidad de sustituciones por cada 100 nucleótidos.

El análisis filogenético con secuencias de los ITSs demostró que las cepas mexicanas forman un nodo en común con las accesiones JF906754 (ARSEF8679, cepa aislada de Psocidos) y JF894156 (ARSEF8387, cepa aislada de Ciicidos) depositadas en el GenBank como *H. citriformis*, aunque el artículo publicado por Toledo *et al.* (2013) establece que las secuencias de esas accesiones corresponden a una especie no definida de *Hirsutella*. Nuestros resultados confirman que las secuencias de las cepas aisladas de *D. citri* en México, representan una especie distinta a la reportada por estos autores. Por otra parte, la secuencia del gen 28S mostró elevada relación de las cepas mexicanas de *Hirsutella* con secuencias de las accesiones AY518376 (Liu *et al.* 2005) y DQ075678 (Boucias *et al.* 2007) depositadas en el GenBank como *H. citriformis* y aisladas de delphacidos de Indonesia. Sin embargo, las accesiones KJ803256 y EF3633707 depositadas en el GenBank como *H. citriformis*, no tienen relación estrecha con las cepas mexicanas de este hongo entomopatógeno, lo que sugiere que ambas secuencias pertenecen a diferentes especies de *Hirsutella*.

Los análisis filogenéticos con secuencias ITSs y 28S demostró que las cepas mexicanas tienen elevada similaridad entre ellas y que es posible separarlas de otros taxones del género. Además, la relación de las cepas mexicanas de *Hirsutella* con secuencias de especies de *Ophiocordyceps* y *Cordyceps* en los análisis megablast hace que sea necesario realizar un estudio filogenético y morfológico profundo para establecer con mayor certidumbre la relación que existe entre estos telomorfos y especies de *Hirsutella*. En el GenBank también se encuentran depositadas secuencias de otros loci del ADN (18S, β -tubulina) de cepas de *H. citriformis* (Subandiyah *et al.* 2000), que debido al escaso número de especies que cuentan con estas secuencias se limita su uso para fines de establecer relaciones entre la mayoría de las especies del género.

Los resultados obtenidos demuestran que las secuencias ITSs son de mayor utilidad respecto a la secuencia del gen 28S para la separación de taxones dentro del género *Hirsutella*. Lo anterior es apoyado por la mayor variación expresada en sustituciones por cada 100 nucleótidos observada en las secuencias ITS respecto a las secuencias del gen 28S. En base a que *H. citriformis* es la única especie de *Hirsutella* atacando a *D. citri* y la similitud de secuencias de cepas mexicanas con el gen 28S de

secuencias descritas como esta especie (Boucias et al. 2007; Liu et al. 2005), se considera que las cepas mexicanas de *Hirsutella* aisladas de *D. citri* corresponden a la especie *H. citriformis*.

Sin embargo, el análisis de secuencias ITSs de las cepas ARSEF 532 y ARSEF2346 (accesiones AY518376 y DQ075678 en GenBank, respectivamente) podría establecer con mayor certidumbre la relación de nuestras cepas con *H. citriformis* atacando a *D. citri* y otros insectos hemípteros en el mundo.

Se considera que las cepas aisladas de siete estados de México corresponden a *Hirsutella citriformis* en base al hospedero del cual se aislaron, a la similitud de secuencias del gen 28S del ADNr con las de cepas aisladas de delfacidos de Indonesia y a las características morfométricas de estructuras de reproducción.

Las secuencias ITSs y 28S de las cepas INIFAP-Hir-1, INIFAP-Hir-2, INIFAO-hir-5, INIFAP-Hir-6, INIFAP-Hir-7, IB-Hir-1 e IB-Hir-2 se encuentran depositadas en el GenBank con las accesiones que se enlistan a continuación.

28S.sqn Campeche_28S KC911842
28S.sqn Chiapas_28S KC911843
28S.sqn Colima_28S KC911844
28S.sqn Q._Roo_28S KC911845
28S.sqn Tabasco 28S KC911846
28S.sqn Veracruz 28S KC911847
28S.sqn Yucatán 28S KC911848
ITS.sqn Colima KC911849
ITS.sqn Campeche KC911850
ITS.sqn Chiapas KC911851
ITS.sqn Q. Roo KC911852
ITS.sqn Tabasco KC911853
ITS.sqn Veracruz KC911854
ITS.sqn Yucatán KC911855

9. Bioensayos

9.1 Bioensayos por contacto

En los resultados obtenidos del primer bioensayo, con solo dos cepas, se observó que la mortalidad en los insectos inició a los 6 días postaplicación con porcentajes de 7.5 y 3.1 para la cepa INIFAP-Hir-1 e INIFAP-Hir-4 respectivamente, mientras que en el control no tratado fue 1.8 %. El último registro de mortalidad se realizó 27 días después del inicio del experimento, donde se obtuvo la tasa media de mortalidad de 98 ± 4.72 y 70 ± 15.07 % para los aislados INIFAP-Hir-1 e INIFAP-Hir-4 respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos, ($F=23.7058$; $gl=2, 21$; $P < 0.001$) comparadas de acuerdo al método de Tukey al 0.05. En el control no tratado la mortalidad total registrada fue de 12 ± 6.52 (Figura 21).

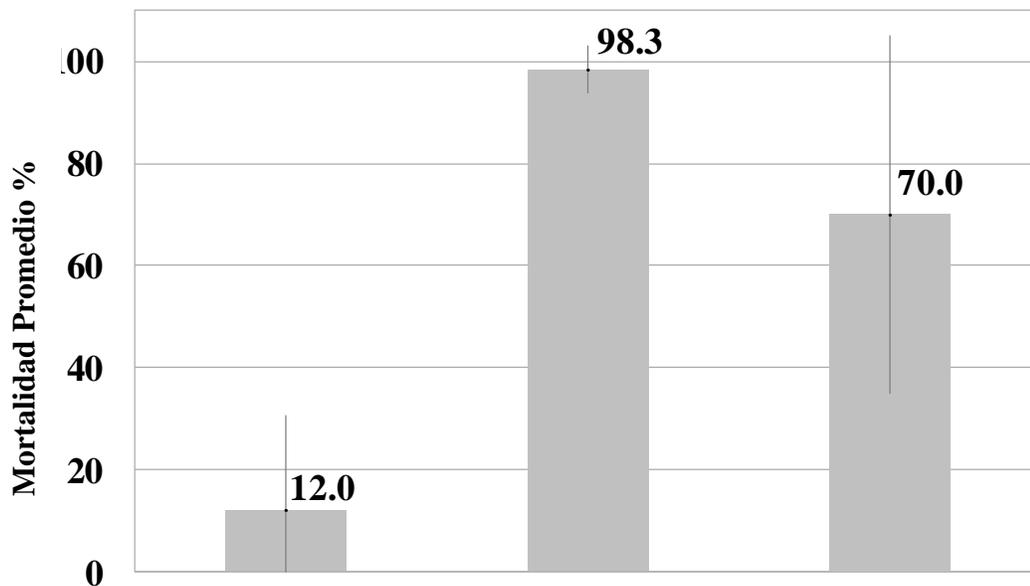


Figura 21. Porcentaje de mortalidad de adultos de *Diaphorina citri* causada por dos cepas de *Hirsutella citriformis* en pruebas de laboratorio. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa en relación al control al nivel 0.05 del análisis de comparación de medias de Tukey.

En el segundo bioensayo contra adultos de *D. citri* la mortalidad inició al igual que en el anterior a los 6 días después de haber sido inoculados; el porcentaje inicial de mortalidad fue entre 5.5 y 1.1 para las cepas INIFAP-Hir-2 e IB-Hir-2, respectivamente, mientras que en el testigo no tratado la mortalidad fue de 4.2 %. El último registro de

supervivencia se realizó a los 19 días de iniciado el experimento, donde la cepa INIFAP-Hir-4 causó el mayor porcentaje promedio de mortalidad, 61.3%, aunque sin diferencias significativas con respecto a la cepa INIFAP-Hir-2, ($F=3.1965$; $gl = 6, 42$; $P = 0.011$) que causó 51.3%, en el segundo grupo; mientras que con diferencia significativa parcial con respecto a las anteriores se ubicaron las cepas IB-Hir-2, con 36.5% e INIFAP-Hir-6 con 42.3%, mientras que en el tercer grupo se encontró a la cepa INIFAP-Hir-7 con 30.3%, en el último lugar quedó INIFAP-Hir-5, con 24%, (Figura 22). La mortalidad ocasionada por cepas de *H. citriformis* se presentó entre los 6 y 19 días postaplicación. En el testigo no tratado se observó un promedio de mortalidad de 18.4 %.

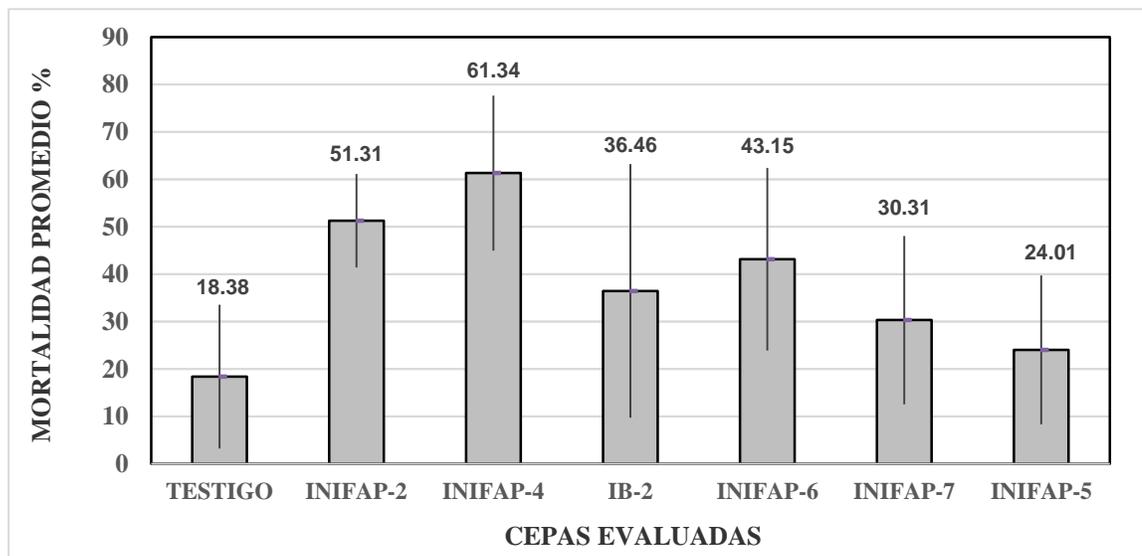


Figura 22. Mortalidad promedio causado por 6 cepas de *Hirsutella citriformis* contra adultos de *Diaphorina citri*. Letras diferentes en cada barra indican que existe diferencia significativa al nivel del 0.05 del análisis de comparación de medias de Tukey.

En el tercer bioensayo la mortalidad inició también el día 6 posterior a la inoculación; el porcentaje inicial de mortalidad fue entre 7.0 y 2.84 para las cepas IB-Hir-2 e INIFAP-Hir-2 respectivamente, mientras que el control no tratado mostró 1.5 %. El último registro de supervivencia se realizó a los 27 días de iniciado el experimento, en el cual la cepa IB-Hir-2 presentó la mayor tasa promedio de mortalidad con valor de 87.43 % aunque sin diferencia significativa respecto de las cepas INIFAP-Hir-7 (85.76), INIFAP-Hir-2 (2 nuevo aislado monospórico de un bioensayo anterior) (83.55) e

INIFAP-Hir-2 (1 aislado original de la cepa) (82.48) ($F=3.0773$; $gl=9, 40$; $p=0.007$), en el segundo grupo con diferencia parcial con respecto a las anteriores se ubicaron las cepas IB-Hir-2 con 79.73 %, INIFAP-Hir-4 (1 aislado original de la cepa) con 73.78, INIFAP-Hir-4 (2 nuevo aislado monospórico de un bioensayo anterior) con 69.91 % e INIFAP-Hir-5 con 64.88 %, con el menor porcentaje de mortalidad se ubicó a la cepa INIFAP-Hir-6 con 50.78 % mientras que el testigo no tratado presentó 20.73 % de mortalidad (Figura 23).

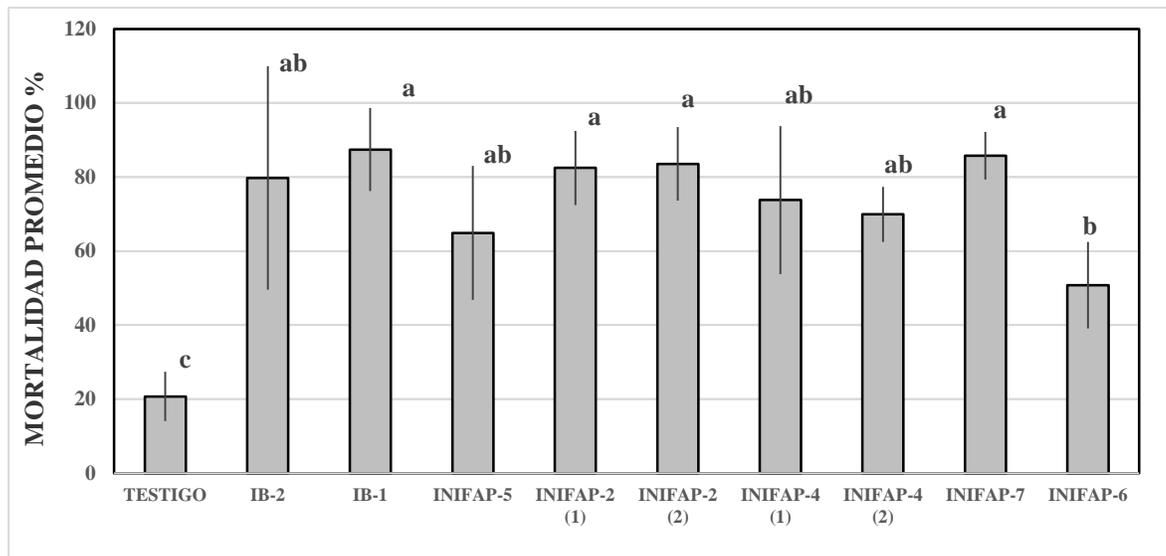


Figura 23. Porcentaje de mortalidad promedio causado por 9 cepas de *Hirsutella citriformis* contra adultos de *Diaphorina citri*. Letras diferentes en cada barra indican que existe diferencia significativa al nivel del 0.05 del análisis de comparación de medias de Tukey. (Las cepas INIFAP-2 (2) e INIFAP-4 (2) son aislados monospóricos de un bioensayo anterior).

En el cuarto bioensayo al igual que en todos los bioensayos anteriores la mortalidad en los insectos inició a los 6 días después de la inoculación; el porcentaje inicial de mortalidad fue entre 9.53 y 3.32 para la cepas INIFAP-Hir-1 (2) e IB-Hir-2, mientras que en el testigo no tratado se encontró 2.84 %. La mortalidad se presentó en un rango de 6 a 27 días; el análisis de varianza y comparación de medias de Tukey indicó que no hubo diferencia significativa entre las cepas evaluadas presentando el mayor promedio de mortalidad la cepa INIFAP-Hir-1 (1), seguida por IB-Hir-2 con 89.3 %, IB-Hir-1 con 89.2 % e INIFAP-Hir-1 (2) con 86.4 % ($F= 17.3934$; $gl=4, 25$; $P=$

<0.001). La tasa promedio de mortalidad para el testigo no tratado fue 18.5 % (Figura 24).

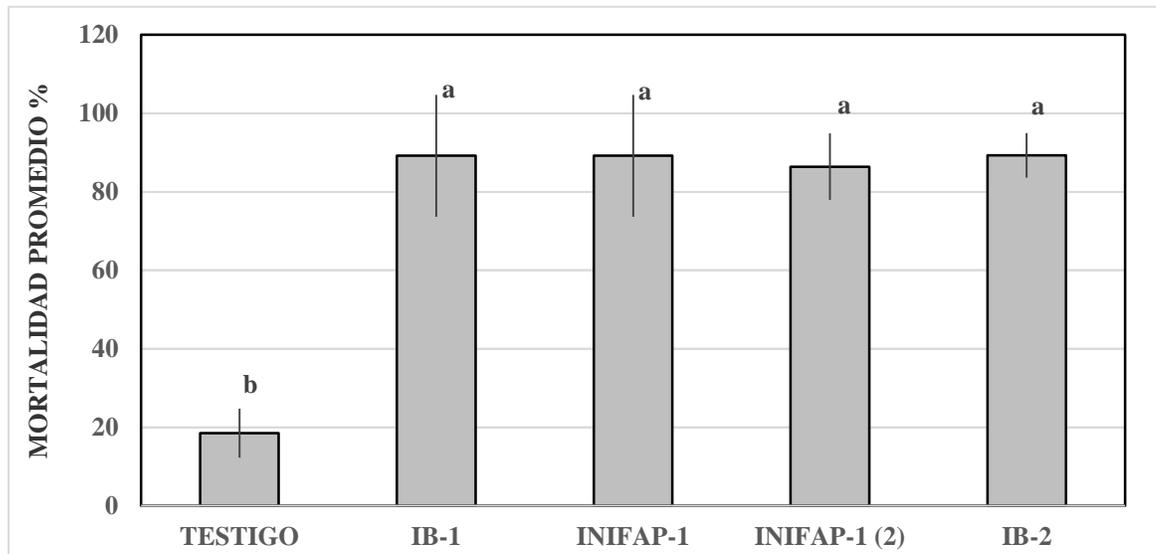


Figura 24. Porcentaje de mortalidad promedio causado por 4 cepas de *Hirsutella citriformis* contra adultos de *Diaphorina citri*. Letras diferentes en cada barra indican que existe diferencia significativa al nivel del 0.05 del análisis de comparación de medias de Tukey. (La cepa INIFAP-1 (2) es un aislado monospórico de un bioensayo anterior).

En el quinto bioensayo el porcentaje inicial de mortalidad fue entre 10.6 y 1.63 para las cepas IB-Hir-2 e INIFAP-Hir-6 respectivamente mientras que la mortalidad en el testigo no tratado fue 1.2 %. El último registro de mortalidad se realizó a los 27 días de iniciado el experimento, en el cual la cepa INIFAP-Hir-1 presentó el mayor promedio de mortalidad de 88.07 % aunque sin diferencia significativa respecto de las cepas IB-Hir-2 (87.68) e IB-Hir-1 (85.62) ($F = 45.70$; $gl = 8, 45$; $P < 0.001$), en un segundo grupo con diferencia parcial con respecto a las anteriores se ubican las cepas INIFAP-Hir-2 (81.67) e INIFAP-Hir-4 (80.55), mientras que las cepas INIFAP-Hir-6 (70.63) e INIFAP-Hir-7 (69.1) se ubicaron en el tercer grupo, con diferencia significativa respecto del primer grupo; con el menor porcentaje de mortalidad se ubicó a la cepa INIFAP-Hir-5 con 52.12 % mientras que el testigo no tratado presentó 7.08 % de mortalidad (Figura 25).

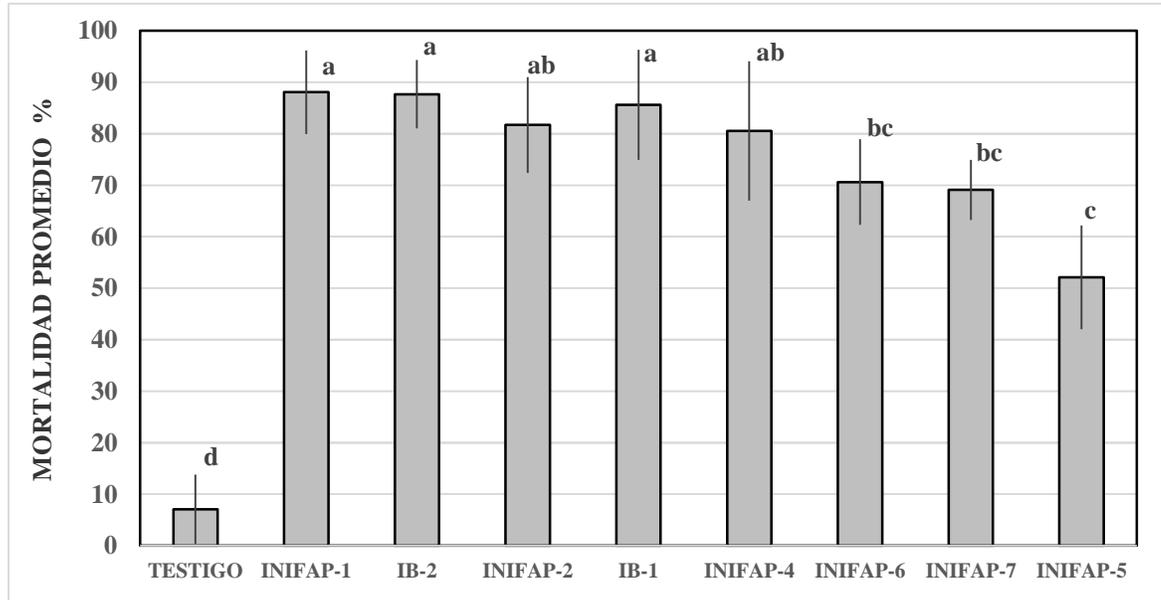


Figura 25. Porcentaje de mortalidad promedio causado por 8 cepas de *Hirsutella citriformis* contra adultos de *Diaphorina citri*. Letras diferentes en cada barra indican que existe diferencia significativa al nivel del 0.05 del análisis de comparación de medias de Tukey.

Las 8 cepas evaluadas tuvieron un comportamiento similar a lo reportado por otros investigadores (Meyer *et al.* 2007 y Casique-Valdés *et al.* 2011) en lo referente al inicio de mortalidad (6 días) y la aparición de sinemas (10 días) en los cadáveres de *D. citri*; los cuales reportan un inicio de mortalidad en adultos a los 6 días y un comienzo en la formación de sinemas a los 10 días, respectivamente. Nuestras tasas de mortalidad media logradas en los bioensayos contra *D. citri*, son menores a las reportadas por otros investigadores que han trabajado con este hongo (Meyer *et al.* 2007 y Casique-Valdés *et al.* 2011) los cuales reportan una mortalidad del 100 % después del noveno y sexto día, respectivamente. Aunque nosotros evaluamos ocho cepas de *H. citriformis*, aisladas de diferentes regiones citrícolas del país, nuestros resultados difirieron de los obtenidos por dichos investigadores, probablemente debido a que las condiciones en las cuales se realizaron los bioensayos fueron diferentes a las utilizadas por ellos, así como las cepas utilizadas ya que diferentes aislados, por lo general exhiben diferentes grados de patogenicidad; sin embargo tomando en cuenta la especificidad que tiene este hongo

sobre su insecto blanco, nuestros resultados son los suficientemente concluyentes para recomendar su uso potencial para el control de *D. citri* en México.

9.2 Bioensayo contra adultos de *D. citri* con asperjado de blastosporas

En los resultados del bioensayo se observó que la mortalidad en los insectos inició a los 6 días al igual que en el bioensayo de contacto, el porcentaje inicial de mortalidad fue entre 13.9 y 5.02 para las cepas INIFAP-Hir-2 e INIFAP-Hir-1 respectivamente, mientras que en el testigo no tratado fue 4.05 %. El análisis de varianza mostró diferencia significativa entre las cepas probadas ($F = 3.0636$; $gl = 8, 54$; $P = 0.007$). Las cepas mostraron porcentajes de mortalidad variando de 48.65 a 30.83, donde las cepas que mostraron mayor mortalidad fueron: INIFAP-Hir-5 (48.65 % de mortalidad) e INIFAP-Hir-2(48.47%) seguidas del grupo formado por IB-Hir-1 (44.97 %), INIFAP-Hir-4 (42.54 %), IB-Hir-2 (41.22 %) e INIFAP-Hir-6 (38.94 %), mientras que en un tercer grupo se ubicaron a INIFAP-Hir-7 (31.77 %) e INIFAP-Hir-1 (30.83 %), mientras que el testigo no tratado mostró 17.56 % de mortalidad (Figura 26). La mortalidad de *D. citri* causada por las blastosporas de *H. citriformis* se observó entre los 6 y 27 días postaplicación.

La mortalidad de *D. citri* que se alcanzó con la aplicación las blastosporas de las cepas de *H. citriformis* fue mayor a la reportada por Partida-Valenzuela *et al.* (2012) los cuales obtuvieron mortalidad cercana al 20 % pero menor a la reportada por Sánchez-Saavedra *et al.* (2011), los cuales reportaron el 100 % de mortalidad pero con resultados variables; al igual que estos investigadores tampoco obtuvimos micosamiento en los insectos muertos y esto puede deberse a que los insectos no fueron infectados por los hongos sino que murieron por las toxinas que libera al medio el hongo, al crecer en cultivo líquido, como ha sido reportado para cepas de *H. thompsonii* por Liu *et al.* (1995) y Rosas-Acevedo *et al.* (2003). Estos resultados nos indican que es importante el seguir evaluando la posibilidad de utilizar a *Hirsutella* en cultivo líquido ya que en estos medios crece con mayor rapidez y con abundante producción de blastosporas y micelio (Romero-Rangel *et al.* 2012) pero sin producción de conidios.

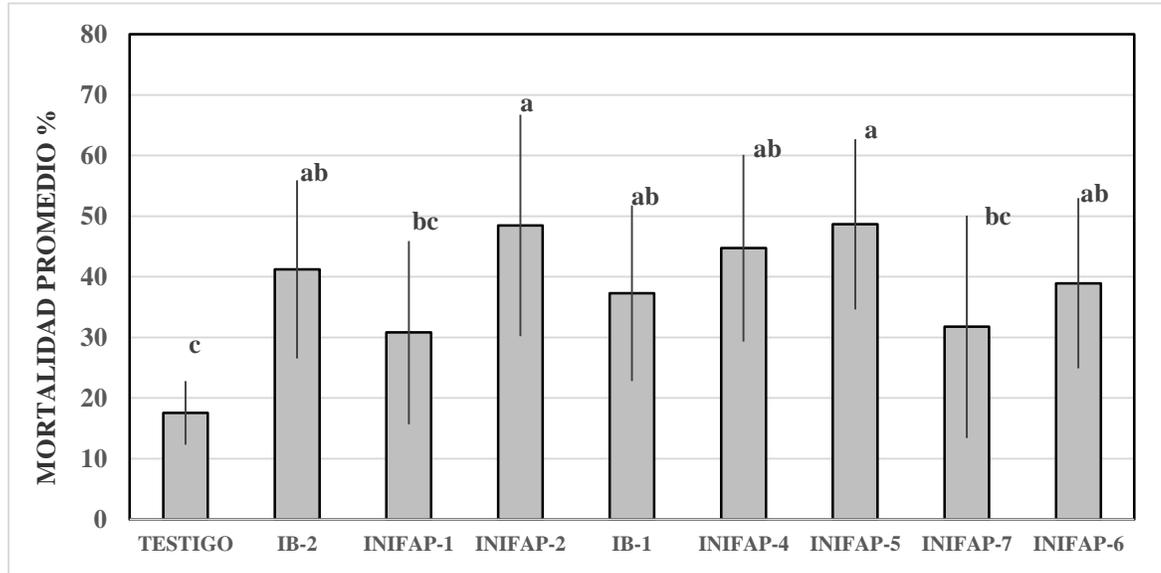


Figura 26. Porcentaje de mortalidad promedio causada por blastosporas de ocho cepas de *Hirsutella citriformis* contra adultos de *Diaphorina citri* en bioensayo de laboratorio. Letras diferentes en cada barra indican que existe diferencia significativa al nivel del 0.05 del análisis de comparación de medias de Tukey.

9.3 Bioensayo de conidias formuladas con diferentes sustancias contra adultos de *D. citri*.

En el bioensayo en el cual se probaron conidios formulados de *H. citriformis* (cepa IB-Hir-2), usando diferentes sustancias como talco, y tierra de diatomeas y comparados con solo agua, los mayores porcentajes de mortalidad fueron para los formulados con tierra de diatomeas (67.2) y talco (65.7), sin diferencia significativa entre ellos, pero si comparados con agua (31.8) ($F = 14.6088$; $gl = 5, 24$; $P < 0.001$). El último registro de mortalidad de esta prueba se realizó a los 24 días de iniciado el experimento. (Figura 27).

Es posible que el valor tan bajo que se obtuvo en estas aplicaciones comparando los porcentajes de mortalidad obtenidos por esta cepa cuando se realiza inoculación por contacto, pudiera ser ocasionado por una disminución en el porcentaje de germinación de los conidios en los formulados en polvo (talco y tierra de diatomeas) por el secado al que se les sometió; mientras que en el formulado con agua para ser aplicado por asperjado los conidios perdieran su capa mucilaginosa ya que esta es soluble en el agua

y esto disminuyó la capacidad de adherencia natural que se presenta en los conidios de este hongo.

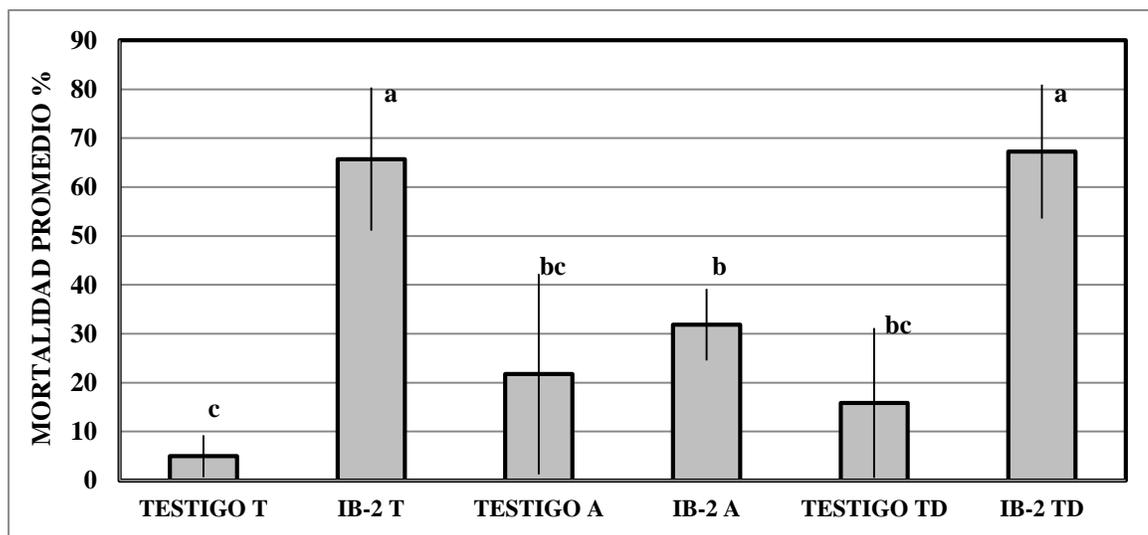


Figura 27. Porcentaje de mortalidad promedio causada por formulados de conidias de *Hirsutella citriformis* con diferentes sustancias, Talco (T), Tierra de Diatomeas (TD) y Agua (A) contra adultos de *Diaphorina citri* en bioensayo de laboratorio. Letras diferentes en cada barra indican que existe diferencia significativa al nivel del 0.05 del análisis de comparación de medias de Tukey.

9.4 Bioensayo contra adultos de *Diaphorina citri* con asperjados de conidias

En los resultados del bioensayo, donde se evaluaron dos de las cepas, se observó que la mortalidad en los insectos inició a los 6 días al igual que en el bioensayo de contacto, el porcentaje inicial de mortalidad fue entre 11.11 y 10.11 para los aislados INIFAP-Hir-1 e IB-Hir-2 respectivamente, mientras que en el testigo no tratado fue 2.5 %. El último registro de mortalidad se realizó a los 24 días de iniciado el experimento en el cual las dos cepas presentaron significativamente similares porcentajes de mortalidad, (69.5 y 69.4%, para IB-Hir-2 e INIFAP-Hir-1 respectivamente) ($F= 23.48$, $gl= 2, 6$; $P < 0.001$), mientras que en el testigo no tratado la mortalidad fue 18.18 % (Figura 28).

Estos resultados de mortalidad fueron menores a los obtenidos con las mismas cepas al ser inoculadas por contacto, esta diferencia en la mortalidad probablemente fue ocasionada por la pérdida de la envoltura mucilaginosa hidrosoluble de los conidios de *Hirsutella*, ya que parte de esta se pierde durante la preparación del inóculo en agua,

pero observamos que la adición de la goma de acacia incrementó el porcentaje de mortalidad que obtuvimos al formular solo con agua. Aun así los valores obtenidos en el bioensayo son lo suficientemente concluyentes para demostrar el potencial de uso de estas cepas y posteriormente asperjar inóculos de nuestros aislados en bioensayos de campo.

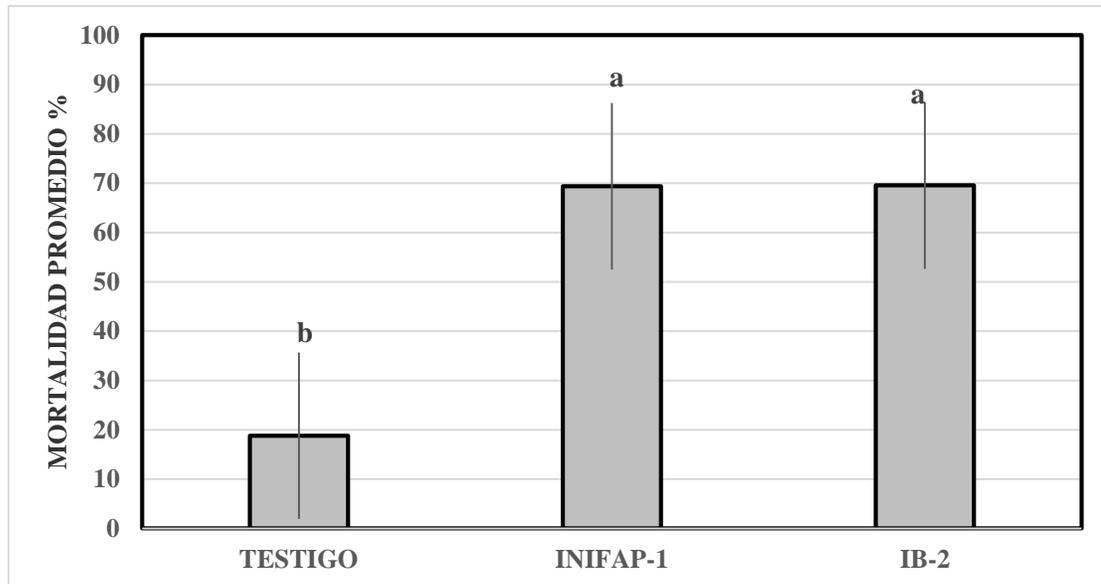


Figura 28. Porcentaje de mortalidad promedio causada por conidias asperjadas de 2 cepas de *Hirsutella citriformis* contra adultos de *Diaphorina citri* en bioensayo de laboratorio. Letras diferentes en cada barra indican que existe diferencia significativa al nivel del 0.05 del análisis de comparación de medias de Tukey.

9.5 Bioensayo de conidias contra ninfas de *D. citri*.

El último registro de mortalidad se realizó a los 7 días de iniciado el experimento, en el cual la cepa INIFAP-Hir-2 presentó el mayor promedio de mortalidad con valor de 81.67 %, mientras que el menor porcentaje de mortalidad lo mostró la cepa INIFAP-Hir-4 con 50.48 % ($F = 3.062$; $gl = 8, 27$; $P = 0.006$) mientras que el testigo no tratado presentó 20.43% de mortalidad (Figura 29). No se observó micosamamiento producido por *H. citriformis* en las ninfas muertas. Resultados similares fueron reportados por Meller *et al.* (2007) cuando realizó el bioensayo contra ninfas de *D. citri*, donde tampoco observó micosamamiento, esto puede deberse a que el tiempo es poco para observar el

crecimiento característico de *Hirsutella* ya que normalmente en los bioensayos con adultos este micosamiento aparece diez días después de la inoculación.

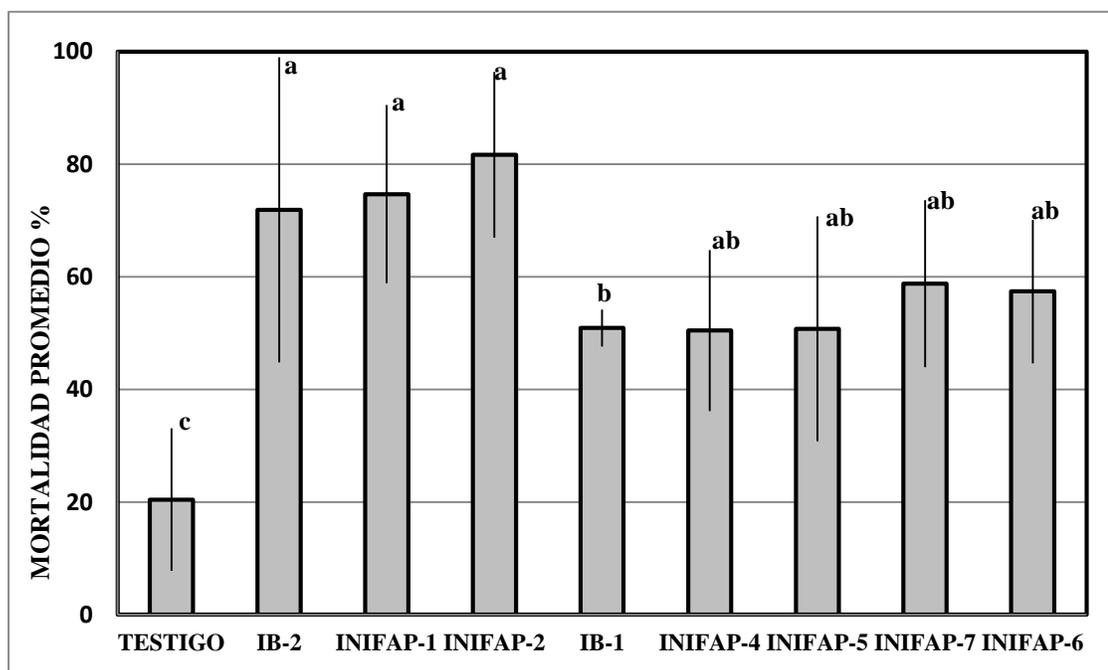


Figura 29. Porcentaje de mortalidad promedio causada por conidias de 8 cepas de *Hirsutella citriformis* contra ninfas de *Diaphorina citri* en bioensayo de laboratorio. Letras diferentes en cada barra indican que existe diferencia significativa al nivel del 0.05 del análisis de comparación de medias de Tukey.

9.6 Bioensayo contra el depredador *Hippodamia convergens*

Este bioensayo fue realizado para observar la posible mortalidad que podrían causar las cepas de *H. citriformis* sobre el depredador *H. convergens*. Después de 24 días de exposición a las cepas fúngicas se observó que la cepa IB-Hir-1 presentó el mayor promedio de mortalidad con valor de 12.67 % sin diferencias significativas de las demás cepas INIFAP-Hir-2 (11.17), IB-Hir-2 (10.67) e INIFAP-Hir-1 (8.72), ni con el testigo no tratado, que presentó 10.67% ($F=0.1623$; $gl = 4, 20$; $p = 0.953$), (Figura 30). No se observó la micosis característica producida por *Hirsutella* en ningún insecto muerto. Nuestros resultados difieren de bioensayos realizados por Gandarilla-Pacheco *et al.* (2012), los cuales reportan una mortalidad promedio en el mismo insecto depredador de 6.25 – 25 % presentada por cepas de los hongos entomopatógenos *Isaria fumosorosea* y

Beauveria bassiana y también difiere del trabajo reportado por Torres-Acosta *et al.* (2012) quienes evaluaron cepas de *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae* y reportaron porcentajes de mortalidad de 7.5 – 69.4.

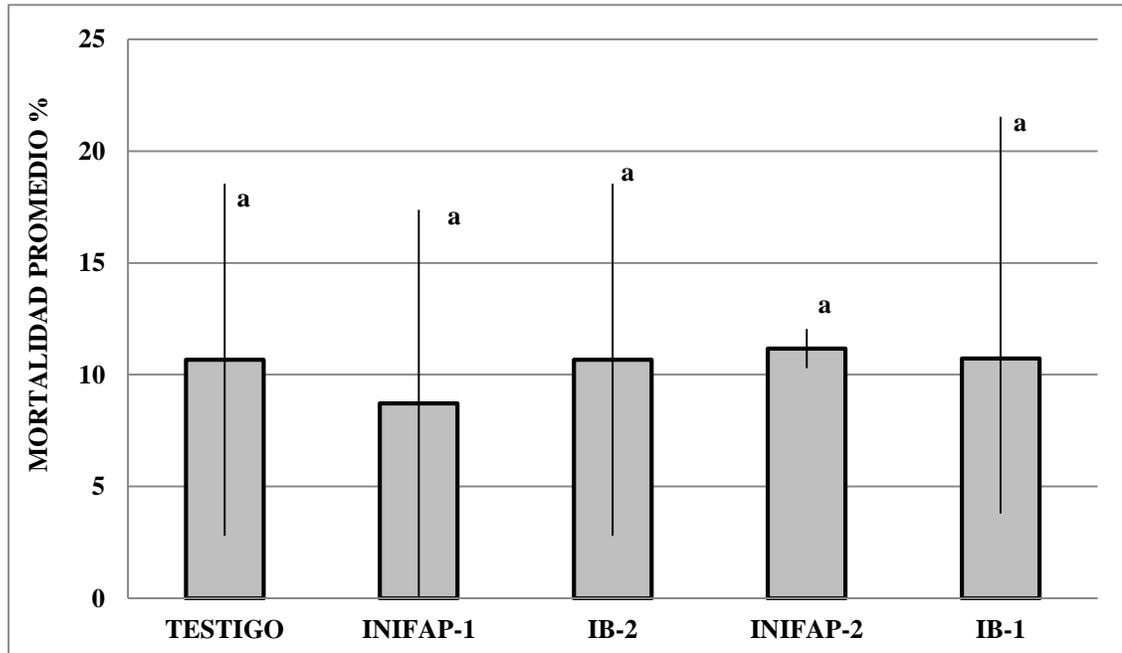


Figura 30. Porcentaje de mortalidad promedio causada por conidias de 4 cepas de *Hirsutella citriformis* en adultos de *Hippodamia convergens* en bioensayo de laboratorio.

9.7 Bioensayo contra el depredador *Chrysoperla rufilabris*

El bioensayo fue implementado igual que el realizado con *Hippodamia convergens* para observar la posible mortalidad de *H. citriformis* sobre *C. rufilabris*. Después de 30 días de exposición a las cepas fúngicas mortalidad observada se presentó en rango de 18.75 y 25%, donde la cepa INIFAP-Hir-2 presentó el mayor porcentaje de mortalidad (25%) sin diferencias significativas con las demás cepas ni con el testigo no tratado ($F=0.577$; $gl=4, 15$; $P=0.684$) (Figura 31). Los datos de mortalidad incluyeron tanto larvas y pupas muertas en el bioensayo. No se observó micosamiento en ningún insecto muerto.

Gandarilla-Pacheco *et al.* (2012) evaluó cepas de *Isaria fumosorosea* y de *Beauveria bassiana* sobre insectos crisópidos (*Eremochrysa punctinervis* y *Ceraeochrysa valida*) reportando una mortalidad promedio de 49.8 – 50 %.

La mortalidad encontrada en el bioensayo con estos insectos benéficos en los controles con respecto a los tratamientos fueron no significativo, lo que nos señala que el deceso de los insectos se pudo haber debido a la manipulación del insecto o cuestiones naturales, además ninguno de los insectos muertos fue infectado por el hongo. Los resultados obtenidos en los cuales no se presentó mortalidad por las cepas fúngicas, implican que es posible el uso de *H. citrifomis* en un manejo integrado contra *D. citri* en campo.

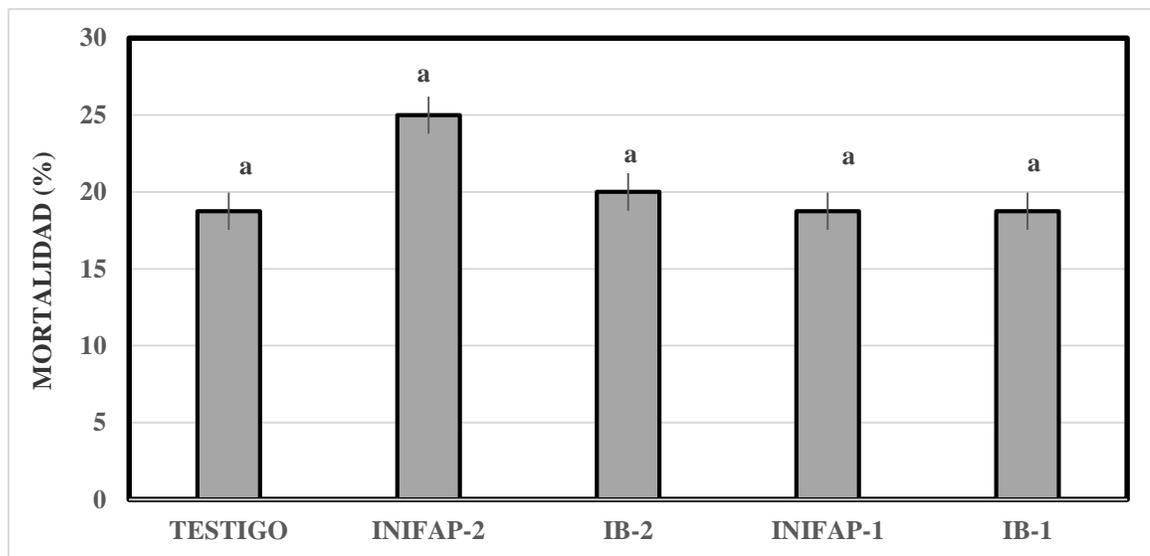


Figura 31. Porcentaje de mortalidad causada por conidias de 4 cepas de *Hirsutella citrifomis* contra adultos de *Chrysoperla rufilabris* en bioensayo de laboratorio

9.8 Concentración letal media.

Bajo condiciones de laboratorio la CL₅₀ y CL₉₀ obtenidas para el aislado INIFAP-Hir-1 fueron, 3.4×10^6 y 2.67×10^8 respectivamente (Tabla 17). Estas concentraciones letales tienen valores más altos que los reportados para otros hongos entomopatógenos usados en el control de otros insectos como *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium* e *Isaria*

fumosorosea en los cuales reportan CL₅₀ que van desde concentraciones de 10³ a 10⁵ (Jiménez-Medina et al. 1998; Sabbour et al. 2011; Hubner-Campos et al. 2013).

Tabla 17. Concentración letal media y concentración letal 90 de conidias de cepa INIFAP-Hir-1 de *Hirsutella citriformis* aplicadas en adultos de *Diaphorina citri*.

	Pendiente	Intervalos de confianza 95%		X ²
		Bajo	Alto	
CL ₅₀	0.443643	1.38 x 10 ⁶	8.51 x 10 ⁶	7.0055
CL ₉₀	0.443643	2.18 x 10 ⁷	2.44 x 10 ⁹	7.0055

¹ Determinadas usando el análisis Probit. (US. Applied and Environmental Health)

10 Bioensayo de campo

Antes de la aplicación de los conidios de las cepas fúngicas se realizó un muestreo inicial donde se encontraron de 0 a 10 insectos micosados por árbol con promedio de micosamiento general de 3.69%, este número se incrementó posteriormente 30 días después donde se obtuvieron de 0 a 17 insectos micosados para un promedio total de 81.81% (Tabla 18).

Tabla.18 Población general de *D. citri* (adultos vivos y micosados) en los árboles muestreados.

Brotos	Adultos vivos	Adultos muertos micosados	Población Total	% de *micosamiento	Adultos vivos	Adultos muertos micosados	Población Total	% de **micosamiento
Árbol 1	64	2	66	3	0	17	17	100
Árbol 2	41	1	42	2.38	0	11	11	100
Árbol 3	27	1	28	3.57	0	5	5	100
Árbol 4	34	0	34	0	0	6	6	100
Árbol 5	34	3	37	8.1	1	1	2	50
Árbol 6	38	0	38	0	0	1	1	100
Árbol 7	84	10	94	10.63	10	12	22	54.54
Árbol 8	62	0	62	0	1	0	1	0
Árbol 9	122	4	126	3.17	4	6	10	60
Árbol 10	83	1	84	1.19	0	6	6	100
Árbol 11	77	1	78	1.28	2	15	17	88.23
Árbol 12	64	5	69	5.61	0	1	1	100
Total	730	28	758	3.69	18	81	99	81.81

* Evaluación antes de la aplicación de los tratamientos.

** Evaluación treinta días después de la aplicación de los tratamientos.

En este estudio todas las cuatro cepas probadas habían resultado virulentas para *D. citri* en bioensayos a nivel de laboratorio. En el bioensayo de campo se encontró que la cepas más virulentas resultaron ser la INIFAP-Hir-4 (51.049 %) e INIFAP-Hir-2 (50.598 %) con diferencia significativa ($F = 12.1915$; $gl = 5, 54$; $P < 0.001$) con las cepas IB-Hir-2 (39.029%) e IB-Hir-1 (35.725%) y con los testigos (Figura 32). En el testigo (asperjado con agua destilada estéril y goma de acacia al 1%) se observó un promedio de mortalidad de 6.059% mientras que en el testigo absoluto (sin aplicación), el porcentaje de mortalidad fue 4.84 (Figura 32). Los porcentajes de micosamiento por *H. citriformis*, en los insectos muertos presentaron valores de 62.71 para la cepa INIFAP-Hir-2, hasta 20.59 para la cepa IB-Hir-2, mientras que los testigos no tratados mostraron valores del 16.66-20 % (Tabla 19).

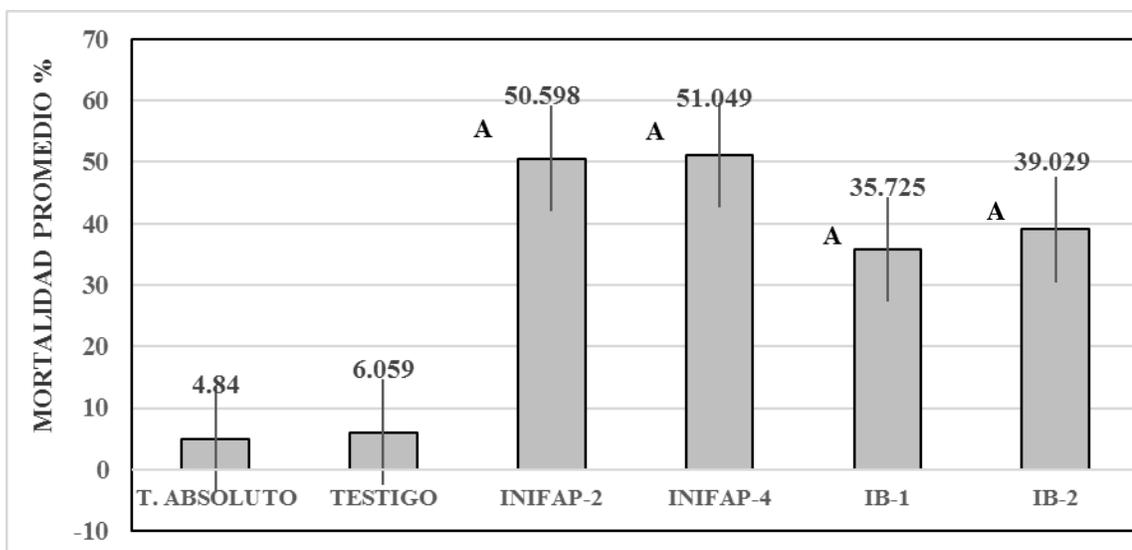


Figura 32. Porcentaje de mortalidad promedio causada por conidias de 4 cepas de *Hirsutella citriformis* contra adultos de *Diaphorina citri* en bioensayo de campo. Letras diferentes en cada barra indican que existe diferencia significativa al nivel del 0.05 del análisis de comparación de medias de Tukey.

Tabla 19. Mortalidad media causada por cuatro cepas de *Hirsutella citriformis* contra adultos de *Diaphorina citri* y % de micosis presentada. Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey $\alpha = 0.05$).

Tratamientos	Mortalidad media \pm DS	% Micosis
INIFAP-Hir-2	50.6 \pm 2.3 a	62.71
INIFAP-Hir-4	51.05 \pm 2.76 a	46.8
IB-Hir-1	35.72 \pm 3.23 a	43.75
IB-Hir-2	39.03 \pm 3.3 a	20.59
Testigo*	6.06 \pm 0.62 b	16.66
Testigo absoluto	4.84 1.61 b	20

*Testigo con adherente

Los resultados del porcentaje de mortalidad obtenida por los tratamientos probados en el bioensayo de campo son mayores a los reportados por Partida-Valenzuela y colaboradores (2012), los cuales reportaron mortalidad entre 19-5% utilizando blastosporas de *H. citriformis* cultivadas en medio líquido y aplicadas por asperjado en

su bioensayo de campo. Además encontramos que los conidios de las cepas de *H. citriformis* resultaron inocuas para depredadores de *D. citri*, ya que encontramos diversos insectos como crisopas, coccinélidos, mantiscas, etc., lo que confirma los resultados conseguidos en laboratorio. Los resultados obtenidos con el uso de *H. citriformis* para el control de *D. citri* en el bioensayo de campo son de gran importancia, ya que podemos asumir su posible uso en la estrategia para combatir plagas como *D. citri* en México.

10.1 Muestreo de *D. citri* para evaluar presencia y dispersión de las cepas aplicadas.

Al muestrear diversos puntos para recuperar las cepas fúngicas aplicadas, así como su dispersión (Tabla 20). Se encontró un gran porcentaje de insectos micosados en las direcciones, este y noroeste; se esperaba encontrar gran cantidad de insectos en dirección noroeste ya que los vientos en Veracruz son los vientos Alisios los cuales corren de sureste a noroeste. Los porcentajes de insectos micosados por *H. citriformis* variaron entre 0 y 100 % encontrando el mayor porcentaje de insectos micosados en dirección a los vientos Alisios (Noroeste). En la huerta aledaña en la cual se aplicó la cepa INIFAP-Hir-2; se evaluó la presencia de insectos micosados y se encontró 469 insectos micosados de un total de 570 con un porcentaje de micosamiento de 70.35. En algunos de los puntos se encontró con la ausencia total de insectos en los huertos, que suponemos fue debido a la aplicación de insecticidas para controlar al vector. En algunos casos, no se pudo realizar el aislamiento de los hongos de algunos de los insectos colectados, probablemente porque los insectos micosados tenían mucho tiempo y los conidios eran viejos y no germinaron. De los insectos micosados, de los cuales pudimos aislar al hongo *H. citriformis* (hongos de 20 diferentes insectos) se encontró la presencia de tres de las cepas aplicadas, a las cuales se les identificó en base a sus características morfológicas coloniales (Figura 33), a diferentes distancias (Tabla 21).

En el sitio de la aplicación se pudo aislar a las cepas INIFAP-Hir-2 e INIFAP-Hir-4 así como también a la cepa nativa del lugar, Martínez de la Torre (previamente aislada

de insectos colectados antes de la aplicación). En la huerta en la cual se aplicó libremente a la cepa INIFAP-Hir-2, se aisló el hongo en tres de los insectos colectados (Tabla 21); mientras que a la cepa INIFAP-Hir-4, (aplicada en otra huerta), no fue posible recuperarla, ya que no encontramos ningún insecto en la zona, debido a que se había realizado el corte de poda y aplicación de insecticida químico en los árboles de la zona en donde fue aplicada.

Tabla 20. Puntos muestreados cercanos al punto de aplicación, para evaluar la dispersión de las cepas de *Hirsutella citrifomis* aplicadas en el bioensayo de campo.

DIRECCIÓN	DISTANCIA m	DISPERSIÓN DE		<i>H. citrifomis</i>	
		INSECTOS VIVOS	INSECTOS MICOSADOS	INSECTOS TOTAL	PORCENTAJE DE MICOSADOS
ESTE	50*	0	0	0	0
	250	2	3	5	60
	500	96	32	128	25
OESTE	100	16	4	20	20
	50	11	30	41	68.18
	250	0	5	5	100
SURESTE	500	0	3	3	100
	100	41	8	49	16.32
	50	4	1	5	20
NOROESTE	250**	-	-	-	-
	500	9	1	10	10
	100	4	1	5	20
NORNOROESTE	50	1	0	1	0
	250	1	2	3	66.66
	500	39	20	59	33.89
NOROESTE	100	30	30	60	50
	8 Km	2	0	2	0
Huerta alledaña	8 Km	15	58	73	79.45
		169	401	570	70.35

*No se encontró ningún insecto.

** No se nos permitió realizar el muestreo.

Se esperaba encontrar mayor cantidad de insectos micosados en los diferentes puntos evaluados, pero por tratarse de una zona en la cual es común el realizar podas para provocar floración y nueva producción de frutos, además de que los productores utilizan gran cantidad de insecticidas químicos, estos factores fueron adversos para la recuperación de las cepas, sin embargo el haber encontrado algunos insectos muertos por estas cepas en algunos puntos nos indica que es posible realizar aplicaciones con *Hirsutella citrifomis* y obtener un efecto inoculativo-aumentativo ya que se conoce que los cadáveres micosados por este hongo permanecen pegados a los árboles por 68 días en promedio pero pueden permanecer hasta por 168 días (Hall *et al.* 2012).y esto ayudaría a su permanencia y reinoculación en otros nuevos insectos.

Tabla 21. Reaislamiento de las cepas aplicadas y evaluadas en insectos micosados recuperados de la zona de aplicación.

DIRECCIÓN	DISTANCIA m	MICOSADOS	AISLADOS	CEPA
OESTE	50	30	1	IB-Hir-1
			1	INIFAP-Hir-4
	250	5	1	INIFAP-Hir-2
			1	IB-Hir-1
			1	Mtz. Torre
SURESTE	50	1	1	INIFAP-Hir-2
NOROESTE	250	2	1	INIFAP-Hir-2
			1	IB-Hir-1
	500	20	1	IB-Hir-1
			1	Mtz. Torre
			1	IB-Hir-1
HUERTA	8000	58	1	IB-Hir-1
			2	Mtz. Torre
	ASPERJADO	401	1	Mtz. Torre
			1	INIFAP-Hir-2
			2	INIFAP-Hir-4
INIFAP-Hir-2*	ASPERJADO	401	3	INIFAP-Hir-2

*Sitio de aplicación de la cepa INIFAP-Hir-2 (huerta alledaña)



Figura 33. Cepas de *Hirsutella* aisladas de insectos colectados de los puntos de muestreo e identificadas en base a sus características morfológicas de crecimiento colonial. A: cepas aisladas, L: cepa local, Y: INIFAP-Hir-2, X: INIFAP-Hir-4, V: IB-Hir-1. C: IB-Hir-2.

CONCLUSIONES

- 1.- Se logró aislar cinco cepas de *H. citriformis* de insectos micosados de *D. citri* de regiones citrícolas de Yucatán, Campeche, Chiapas, Veracruz y Colima (las cepas de Yucatán, Campeche y Chiapas fueron aisladas por colaboradores del INIFAP de General Terán, Nuevo León).
- 2.- De acuerdo a las características morfométricas de las cepas aisladas y cedidas se identificaron como pertenecientes a la especie *Hirsutella citriformis* Speare.
- 3.- En base a la caracterización molecular de las regiones de los ITS y 28S de las cepas aisladas se encontró que estas especies mexicanas de *Hirsutella* son muy similares genéticamente y fuertemente relacionadas con *H. citriformis*.
- 4.- Las cepas mexicanas de *H. citriformis* mostraron una temperatura óptima de crecimiento a 25 °C con desarrollo y más conidiación en medios enriquecidos con extracto de levadura a diferentes concentraciones dependiendo de la cepa.
- 5.- Todas las cepas estudiadas produjeron dos tipos de exudados, excretados al medio: 1) tipo proteico (probablemente Hirsutellina A) y 2) tipo carbohidratos (pueden ser exopolisacáridos), presentándose como gotas de color amarillo claro (proteínas) y cristalino (carbohidratos) en los medios de agar, en su fase de crecimiento.
- 6.- Las sustancias producidas por las cepas en cultivo líquido, son muy abundantes de tipo goma, y gelatinizan el medio, por lo cual no es posible recuperar blastosporas ni la biomasa producida.
- 7.- Todas las cepas, en bioensayos a nivel laboratorio mostraron ser patógenas para *D. citri* Kuwayama, las que mostraron mayor patogenicidad fueron las cepas INIFAP-Hir-1, INIFAP-Hir-2, INIFAP-Hir-4, IB-Hir-1 e IB-Hir-2.
- 8.- Se obtuvo un porcentaje mayor de mortalidad contra adultos de *D. citri* al realizar la aplicación de conidios por contacto que por asperjado de conidios.
9. Se incrementó el porcentaje de mortalidad de adultos de *D. citri* al adicionar al inóculo para aplicación, goma de acacia al 1% como adherente.
- 10.- Bajo condiciones de laboratorio, el aislado INIFAP-Hir-1 mostró CL₅₀ y CL₉₀ de 34 x 10⁵ y 26.7 x 10⁷ conidios/mL⁻¹ respectivamente.

11.- Las cepas de *H. citriformis* evaluadas contra depredadores de *D. citri*, como *Hippodamia convergens* y *Chrysoperla rufilabris* probaron ser relativamente inocuas hacia esos depredadores lo que prueba la alta selectividad hacia el insecto blanco reportado para el género *Hirsutella*.

12.- En el bioensayo de campo las cuatro cepas evaluadas fueron patógenas hacia el insecto blanco, obteniendo mortalidades promedio alrededor del 50 %.

13.- Tres de las cepas de *H. citriformis* aplicadas en campo mostraron dispersión en las parcelas de 50 a 500 m en dirección oeste, sureste y noroeste y a 8 km la cepa IB-Hir-1, con presencia continuada y probabilidad de reinoculación a nuevos hospederos.

RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en la evaluación de la patogenicidad que los aislados mexicanos presentaron sobre *D. citri*, permiten ubicarlos como candidatos convenientes para ser utilizados en el control del vector, además la relativa inocuidad que presentaron hacia dos de los depredadores del insecto, *H. convergens* y *C. rufilabris*, junto con los reportes de la presencia de *H. citriformis* en insectos hemípteros, nos indican que es posible utilizar al hongo en un manejo integrado del vector del HLB.

Por lo cual consideramos importante el continuar evaluando cepas de este hongo en bioensayos de campo contra el vector; así como también se considera de gran importancia el determinar los rangos de humedad relativa en los cuales debe aplicarse el hongo para que sea efectivo en infectar a *D. citri*, y seleccionar el aislado adecuado de acuerdo a la región de donde se aisló, así como a las condiciones ambientales de la región citrícola donde se quiera aplicar este hongo entomopatógeno.

Para que sea redituable el uso de este hongo en el control de insectos plaga, se considera importante continuar la investigación en su cultivo no solo en medios comerciales sino también en sustratos vegetales económicos para seleccionar alguno en el cual se obtenga mayor conidiación y sea factible su uso.

Es importante continuar con la evaluación de la patogenicidad que puedan presentar las blastosporas y micelio de estos hongos, los cuales producen gran cantidad de los mismos en medios líquidos (Romero-Rangel *et al.* 2012); ya que existen reportes de que el uso del micelio de *H. thompsonii* en el control de *Aceria guerreronis* presentó buenos resultados en el control de esta plaga (Sreerama y Singh 2008).

Fenol-cloroformo-isoamilalcohol

Fenol 25 mL

Cloroformo 24 mL

Isoamilalcohol 1 mL

Determinación de proteínas por el método de Bradford

Reactivo de Bradford

Disolver 100 mg de Coomassie blue G en una mezcla de 100 mL de ácido fosfórico al 85% y 50 mL de etanol al 95%. Tras disolución completa del colorante, llevar a un litro con agua destilada fría. El reactivo es estable a temperatura ambiente durante al menos 2 semanas.

Tabla 1. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Tubos	Reactivos		
	Estandar	Agua	R. Bradford
Blanco	0.5 mg/ml	100 µL	1 mL
1	0 µL	75 µL	1 mL
2	25 µL	50 µL	1 mL
3	50 µL	25 µL	1 mL
4	75 µL	0 µL	1 mL
Muestra	100 µL	0 µL	1 mL

Cuantificación de carbohidratos por el método de Dubois (fenol sulfúrico)

Para cada tubo adicionar 0.75 mL de una solución acuosa de fenol al 5%. Mezclando perfectamente, adicionar cuidadosamente 2.25 mL de ácido sulfúrico concentrado, homogeneizar.

Tabla 2. Cuantificación de carbohidratos por el método del Fenol-Sulfúrico.

Tubos	Reactivos			
	Estandar	Agua	Fenol 5 %	H ₂ SO ₄
1	0 mL	1 mL	0.75 mL	2.25 mL
2	0.025 mL	0.975 mL	0.75 mL	2.25 mL
3	0.075 mL	0.925 mL	0.75 mL	2.25 mL
4	0.1 mL	0.9 mL	0.75 mL	2.25 mL
5	0.5 mL	0.5 mL	0.75 mL	2.25 mL
	1 mL	0 mL	0.75 mL	2.25 mL
Muestra	1 mL	0 mL	0.75 ml	2.25 mL

LITERATURA CITADA

- Ahmad SS. 1993. Prevalence of an Entomopathogenic Fungus, *Hirsutella citriformis* on Leucaena Psyllid, *Heterapsylla cubana*, in Malaysia. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 16(2):95-99.
- Alcázar A. 2002. Efecto de la aireación y agitación en la propagación de *Beauveria bassiana* empleando tres tipos de impulsores. Tesis Maestría en Ciencias. Instituto Tecnológico de Durango, México.
- Alemán J, Baños H, Ravelo J. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad Huanglongbing una combinación destructiva para la producción citrícola. *Revista Protección Vegetal* 22(3):154-165.
- Álvarez JF, Montes de Oca FN, Grillo RH. 1994. Hongos entomopatógenos de *Diaphorina citri* Kirk. (Homóptera: Psyllidae) en Jovellanos, Matanzas, Cuba. *Centro Agrícola* p 12.
- Alvarez JF, Montes de Oca FN, Ravelo HG. 2003. Hongos entomopatógenos de *Diaphorina citri* Kirk. (Homoptera: Psyllidae) en Jovellanos, Matanzas. *Centro Agrícola*. 30(2):87.
- Aubert B. 1987. *Trioza erythrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. *Fruits* 42:149–162.
- Aubert B, Grisoni M, Villemin M, Rossolin G. 1996. A case study of Huanglongbing (greening) control in Reunion. In: “Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists” (eds. da Graça JV, Moreno P, Yokomi RK), IOCV, Riverside 276-278.
- 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.
- Bouffard K. 2006. Greening found in 10 counties. *Citrus Industry* 87(1):5–26.
- Bove JM. 2006. Huanglongbing: a destructive, newlyemerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88:7-37.

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal Biochemistry* 72:248-254.
- Burckhardt D, Ouvrard D. 2012. A revised classification of the jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea). *Zootaxa* 3509:1-34.
- Cabrera RI, Lopez A. 1977. Estudio sobre la conservacion de la flora micologica de los citricos en Cuba. *Ciencia y Tecnología Agrícola Serie Citricos y Otros Frutales* 1:97-112.
- Cabrera RI, González C, Hernández D, Rodríguez JL. 2004. Presencia del hongo *Hirsutella citriformis* sobre *Diaphorina citri* Kuw. (Homoptera: Psyllidae) en los cítricos de Cuba. *Levante Agrícola* 43(369).
- Capoor SP, Rao DG, Viswanath SM. 1967. *Diaphorina citri* Kuway., a vector of the greening disease of citrus in India. *Indian Journal of Agricultural Science* 37:572-576.
- Carballo M. 1998. Formulación de hongos entomopatógenos. *Revista Manejo Integrado de Plagas* 47:1-4.
- 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* 94:703-705.
- Chandrapatya A, Dilokkunanant V. 1989. Disponible en <http://anchan.lib.ku.ac.th/kukr/handle/003/12216>
- Coletta-Filho HD, Targon MLPN, Takita MA, De Negri JD, Pompeu JJ, Machado MA. 2004. First Report of the Causal Agent of Huanglongbing ("*Candidatus Liberibacter asiaticus*") in Brazil. *Plant Disease* 88:1382.
- Cortez-Madrigal H. 2006. Efecto de coadyuvantes en *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare y Gams y su virulencia hacia *Toxoptera aurantii* Boyer. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24:59-64.
- Da Graca JV, Korsten L. 2004. Citrus Huanglongbing: Review, present status and future strategies, p. 229-245. S.A.M.H. Naqvi (ed.) *Diseases of fruits and vegetables*, Vol. 1. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.

- Dubois M, Gilles KA, Hamilton J, Rebers P, Smith. 1956. "Método colorimétrico de fenol-sulfúrico para microdeterminación de carbohidratos totales". Química Analítica.
- Étienne J, Quilici S, Maribel D, Franck A. 2001. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). *Fruits* 56:307-315.
- Evans HC, Elliot SL, Hughes DP. 2011. Hidden Diversity Behind the Zombie-Ant Fungus *Ophiocordyceps unilateralis*: Four New Species Described from Carpenter Ants in Minas Gerais, Brazil. *PLOS ONE* 6: e17024. doi:10.1371/journal.pone.0017024
- Feng MG, Poprawski TJ, Khachatourians GG. 1994. Technology for production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status worldwide. *Biocontrol Science and Technology* 4:3-34.
- Gandarilla-Pacheco FL, López-Arroyo JI, Sandoval-Coronado CF, Quintero-Zapata I. 2012. Efecto de *Isaria fumosorosea* Wize (Brown) y *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (Hypocreales: Cordycipitaceae) sobre depredadores de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). El 3^{er} Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. Veracruz, Veracruz, México, Diciembre 10-12.
- Gómez HD. 2008. Experiences on HLB (Huanglongbing) symptoms detection in Florida. El 1^{er} Taller Internacional de plagas cuarentenarias de los cítricos sobre Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus Liberibacter* spp.) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). Hermosillo. Sonora, México.
- González CJC, Castellanos SIE, Fucikovsky ZJ, López HM, Sánchez RG, Elorza MP. 2008. Dinámica de población y tasa de infección de *Diaphorina citri* al hongo *Hirsutella citriformis* en *Citrus sinensis* en Tuxpan, Veracruz, México.
- Guizar-Guzmán L, López-Arroyo JI, Sánchez-Peña SR. 2012. Hongos entomopatógenos (Hypocreales y Entomophthorales) atacando a *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) en la región centro-norte de Veracruz. El 3^{er} Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. Veracruz, Veracruz, México, Diciembre 10-12.

- Halbert SE, Manjunath KL. 2004. Asian Citrus Psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87:330–353.
- Halbert SE. 2005. Pest Alert: Citrus Greening/Huanglongbing. Disponible en <<http://www.doacs.state.X.us/pi/chrp/greening/citrusgreeningalert.html/>>.
- 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. *Journal of the International Organization for Biological Control*. Published online.
- Hernández-Guerra C, Curti-Díaz SA, Sandoval-Rincón JA, Loredó Salazar RX, Guajardo-Panes RA, López-Arroyo JI. 2011. Fluctuación poblacional de enemigos naturales de *Diaphorina citri* en cinco regiones agroecológicas de Veracruz y Puebla. El 2° Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Críticos y el Huanglongbing en México. Texcoco, Estado de México, México, Diciembre 5-6.
- Hubner-Campos, Nunes-Leles RF, Rodrigues R, Luz C. 2013. Efficacy of entomopathogenic hypocrealean fungi against *Periplaneta americana*. *Parasitology International* 62:517-521.
- Hywel-Jones NL. 1997. *Hirsutella* species associated with hoppers (Homoptera) in Thailand. *Mycological Research* 101:1202-1206.
- Jackson MA. 1997. “Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents”. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19:180-187.
- Jagoueix S, Bové JM, Garnier M. 1996. PCR detection of the two ‘*Candidatus*’ liberobacter species associated with greening disease of citrus. *Molecular Cellular Probes* 10:43-50
- Jenkins NE, Heviefó G, Langewald J, Cherry AJ, Lomer CJ. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News Information* 19:21-31

- Jiménez-Medina J, Aldebis HK, Santiago-Alvarez C. 1998. Valoración insecticida de diversos aislados de hongos hifomicetos para el control de la langosta mediterránea *Deciostaurus maroccanus* (Thunberg). Bol. San. Veg. Plagas 24:867-872.
- Khangura JS, Singh H. 1984. Effect of sprayers on the effectiveness and persistence of LVC and EC formulations of dimethoate against *Diaphorina citri* Kuwayama on citrus. J. Entomol. Res. Soc. 8:31–35
- Krasnoff SB, Gupta S. 1994. Identification of the antibiotic phomalactone from entomopathogenic fungus *Hirsutella thompsonii* var. *synnematos*. Journal of Chemical Ecology 20:293–302.
- Leal-López KI, Covarrubias-Cárdenas AG, Maldonado-Blanco MG, Elias-Santos M, Rodríguez-Guerra R, López-Arroyo JI. 2010. Utilización de medios sólidos de avena, germen y salvado de trigo para la producción conidial de *Hirsutella* sp. El 1^{er} Simposio Nacional para el Control Biológico del Psílido Asiático de los Cítricos. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Monterrey, Nuevo León, México, Diciembre 8-9.
- Li R, Jiang X, Guan H. 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):195-202.
- Liu WZ, Boucias DG, McCoy CW. 1995. Extraction and characterization of the insecticidal toxin Hirsutellin A produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii*. Experimental Mycology 19:254-262.
- Liu M, Rombach MC, Humber RA, Hodge KT. 2005. What's in a name? *Aschersonia insperata*: a new pleoanamorphic fungus with characteristics of *Aschersonia* and *Hirsutella*. Mycologia 97:246-253.
- López-Arroyo JI, Jasso J, Reyes MA, Loera-Gallardo J, Cortez-Mondaca E, Miranda MA. 2008. Perspectives for biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Mexico. In: T.R. Gottwald and J.H. Graham Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing, Orlando, Florida, December.

- López-Arroyo JI, Peña MA, Rocha-Peña MA, Loera J. 2004. Occurrence of the asiaticus citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in México. Proceedings of the XVI Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Monterrey, N.L. México, November.
- López-Arroyo JI, González-Hernández A, Reyes-Rosas MA, Rodríguez-Guerra R, Lozano-Contreras M, Jasso-Argumedo J, Cortez-Mondaca E. 2010. Avances en el control biológico de *Diaphorina citri*, vector del patógeno causante del huanglongbing de los cítricos, pp. 87-98. 1^{er} Simposio Nacional para el Control Biológico del Psílido Asiático de los Cítricos, Monterrey, Nuevo León, México, Diciembre 8-9.
- Madla S., Isaka M and Wongsu P. 2008. Modification of culture conditions for production of the anti-tubercular hirsutellones by the insect pathogenic fungus *Hirsutella nivea* BCC2594. Letters in Applied Microbiology 47:74-78.
- Mains EB. 1951. Entomogenous species of *Hirsutella*, *Tilachlidium* and *Synnematium*. Mycologia 43:691-718.
- Manjunath KL, Halbert SE, Ramadugu C, Webb S, Lee RF. 2007. Detection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus Huanglongbing in Florida. Phytopathology 98:387-396.
- Martínez AL, Wallace JM. 1967. Citrus leaf mottle-yellows disease in the Philippines and transmission of the causal virus by a psyllid, *Diaphorina citri*. Plant Disease Reporter 51:692-695.
- Mazet I, Vey A. 1995. Hirsutellin A, a toxic protein produced *in vitro* by *Hirsutella thompsonii*. Microbiology 141:1343–1348.
- McClellan APD, Oberholzer PCJ. 1965a. Greening disease of sweet orange: evidence that it is caused by a transmissible virus. South Africa Journal of Agricultural Science 8: 253-276.
- 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 95:101-109.

- Meyer JM, Hoy MA, Boucias DG. 2008. Isolation and characterization of an *Isaria fumosorosea* isolate infecting the Asian citrus psyllid in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology* 99: 96–102
- Miyakawa T, Tsuno K. 1989. Occurrence of citrus greening in the southern islands of Japan. *Annual Phytopathology Society Japan* 66:667-670.
- Monzón A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Avances en el fomento de productos fitosanitarios no-sintéticos. Manejo Integrado de Plagas* 63:95-103.
- Omoto C, McCoy CW. 1998. Toxicity of purified fungal toxin Hirsutellin A to the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora* (Ash). *Journal of Invertebrate Pathology* 72:319–322.
- Ôtake A. 1990. Bibliography of citrus greening disease and its vectors attached with indices, and a critical review on the ecology of the vectors and their control. Japanese International Cooperation Agency p. 161.
- Padulla LFL, Alves SB. 2009. Susceptibilidad de ninfas de *Diaphorina citri* a hongos entomopatógenos. *Arquivos do Instituto Biológico* 76:297-302.
- Partida-Valenzuela M.P, Boucias DG, Stansly PA. 2012. Efectividad del entomopatógeno *Hirsutella citriformis* Speare (Ascomycota: Sordariomycetes) en el control de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). 3^{er} Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. Veracruz, Veracruz, México, Diciembre 10-12.
- Pérez-González O, Rodríguez-Villarreal RA, Rodríguez-Guerra R, López-Arroyo JI, Elías-Santos M, Maldonado-Blanco MG. 2012. Caracterización de cepas de *Hirsutella* aisladas de *Diaphorina citri* de diferentes estados de México. 3^{er} Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. Veracruz, Veracruz, México, Diciembre 10-12.
- Petch T. 1923b. The genus *Tvic11osfc~i.qcjrln* Petch. *Trans. British Mycological. Society* 9:93-94.
- Rae DJ, LiangWG, Watson DM, Beattie GAC, Huang MD. 1997. Evaluation of petroleum spray oils for control of the Asian citrus psylla, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae), in China. *Int. J. Pest Manag.* 43:71–75

- Reyes-Martínez AY, Casique-Valdés R, Lopez-Arroyo JI, Sánchez-Peña SR. 2010. Aspectos biológicos y ecológicos del hongo *Hirsutella* patógeno de *Diaphorina citri* en Tamaulipas. 1^{er} Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México, Monterrey, Nuevo León, México, Diciembre 8-9.
- Reyes-Rosas MA, López-Arroyo JI, Loera-Gallardo J. 2009. Presencia del hongo entomopatógeno del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*, en Río Bravo, Tamaulipas, México. XXXII Congreso Nacional de Control Biológico, Villahermosa, Tabasco, México, Noviembre 1-6.
- Rivero-Aragon A, Grillo-Ravelo H. 2000. Natural enemies of *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) in the central region of Cuba. *Centro-Agrícola* 27:87-88.
- Robles-Yerena L, Rodríguez-Villarreal RA, Ortega-Amaro MA, Fraire-Velázquez S, Simpson J, Rodríguez-Guerra R, Jiménez-Bremont, JF. 2010. Characterization of a new fungal antagonist of *Phytophthora capsici*. *Scientia Horticulturae* 125:248–255.
- Rodríguez BD, Gato CY. 2010. Métodos alternativos en la conservación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Fitosanidad* 14:241-246.
- Rodríguez-Toledo O, González-Fernández C, Morrero-Artaba L, Robledo-Ortega L. 2008. Bases para el manejo de *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae) en fomento de toronjo Marsh en la localidad de Jaguey Grande. CD de Monografías.
- Romero-Rangel O, Maldonado-Blanco MG, Aguilar-López CC, Elías-Santos M, Rodríguez-Guerra R, López-Arroyo JI. 2012. Production of mycelium and blastospores of *Hirsutella* sp. in submerged culture. *African Journal of Biotechnology* 11:15336-15340.
- Rosas-Acevedo JL, Boucias DG, Lezama R, Sims K, Pescador A. 2003. Exudate from sporulating cultures of *Hirsutella thompsonii* Fisher Inhibit oviposition by the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch. *Applied and Experimental Acarology* 29:213-225.
- Sabbour MM, Ragei M, Abd-El Rahman A. 2011. Effect of Some Ecological Factors on The Growth of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* Against Corn Borers. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5(11):228-235.

- Sajap AS. 1993. Prevalence of an Entomopathogenic fungus, *Hirsutella citriformis* on Leucaena Psyllid, *Heteropsylla cubana* in Malaysia. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 16(2):95-99.
- Salibe AA, Cortez RE. 1968. Leaf mottling, a serious virus disease of citrus in the Philippines. In: University Florida (ed.). *Proceedings of 4th Conference IOCV*, Gainesville 131-136.
- Samson RA. 1974. Paecilomyces and some allied hyphomycetes. *Studies Mycology* 6:1–119.
- Sánchez-Peña SR, Casique-Valdés R, Bidochka M, Reyes-Martínez AY, López-Arroyo JI. 2011. *Hirsutella citriformis*: Caracterización Morfológica y Molecular y Patogenicidad hacia Psylloideos vectores. 2° Simposio Nacional sobre investigaciones para el manejo del Psyllido Asiático de los Cítricos y Huanglongbing en México, Texcoco, Estado de México, México, Diciembre 5-6.
- Sánchez-Saavedra JM, Cortez-Madrigal H, Mora-Aguilera G. 2011. Virulencia de hongos entomopatógenos aislados de *Diaphorina citri* Kuwayama. 2° Taller Int. Plagas Cuarentenarias cítricos. Colima, Colima, México, Agosto.
- Scoller, M. and A. Rubner. 1994. Predacious activity of the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* in dependence of the medium composition. *Microbiological Research*. 149: 145-149.
- Seifert KA, Boulay H. 2004. *Hirsutella uncinata*, a new hyphomycete from Australia. *Mycologia* 96:929–934.
- Singh P, Raghukumar C, Verma P, Shouche Y. 2010. Phylogenetic diversity of culturable fungi from the deep-sea sediments of the Central Indian Basin and their growth characteristics. *Fungal Diversity* 40:89–102.
- Speare AT. 1920. On certain entomogenous fungi. *Slycologia* 12:62-76.
- Subandiyah S, Nikon N, Sato H, Wagiman F, Tsuyumu S, Fakatsu T. 2000. Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera, Psilloidea) in Indonesia. *Mycoscience* 41:509-513.

- Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa JJ, Shrestha B, Spatafora JW. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57:5-59.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tananda Y, Kaya HK. 1993. Fungal infections. *Insect Pathology Academic Press .INC* pp. 318-387.
- Tanzini MR., Batista S, Setten A, Toschi N. 2001. Compatibilidad de agentes tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Manejo Integrado de Plagas* 59:15 -18.
- Teixeira DC, Ayres AJ, Kitajima EW, Tanaka FAO, Danet JL, Jagoueix-Eveillard S, Saillard C, Bové JM. 2005a. First Report of a Huanglongbing-like Disease of Citrus in Sao Paulo State, Brazil, and Association of a New liberibacter Species, “*Candidatus Liberibacter americanus*”, with the Disease. *Plant Disease* 89:107.
- Tirtawidjaja S, Hadewidjaja T, Lasheen AM. 1965. Citrus vein phloem degeneration virus, a possible cause of citrus chlorosis in Java. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 86:235-243.
- Toledo AV, Remes-Lenicov A, Foieri A. 2007. *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Hypocreales): Primer Registro En Planthoppers (Hemiptera: Cixiidae) Asociados A Cultivos De Arroz En Sudamerica. *IV Congreso Argentino de Microbiología General* p. 44.
- Toledo AV, Simurro ME, Balatti PA. 2013. Morphological and molecular characterization of a fungus, *Hirsutella* sp., isolated from planthoppers and psocids in Argentina. *Journal of Insect Science* 13:1-11.
- Torres-Acosta RI, López-Arroyo JI, Torres-Castillo JA, De la Fuente-Saucedo H, Acosta-Díaz E, Martínez-Medina J. 2012. Efecto de hongos entomopatógenos en *Hippodamia convergens*, depredador del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*. *3^{er} Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México*. Veracruz, Veracruz, México, Diciembre pp. 365-370.

- Vaccaro NC. 1994. Comportamiento y difusión de la Chicharrita de los Citrus *Diaphorina citri* (Homoptera-Diaphoridae) en la zona citrícola de Entre Ríos. Carpeta de Información Citrícola. Vol 2. Sección G (27). EEA INTA Concordia, Entre Ríos pp. 3.
- Van der Merwe AJ, Andersen FG. 1937. Chromium and manganese toxicity. Is it important in Transvaal citrus greening? Farming South Africa 12:439-440.
- Wooler A, Padgham D, Arafat A. 1974. Outbreaks and new records. Saudi Arabia. *Diaphorina citri* on citrus. FAO Plant Protection Bulletin 22:93-94.
- Xie PH, Su C, Lin ZG. 1988. A preliminary study on an entomogenous fungus [*Verticillium lecanii*] of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hom.: Psyllidae). Chin. Journal of Biological Control 4(2):92.
- Yang YM, Huang G, Andrew C, Beattie Y, Xia G, Ouyang, Xiong J. 2006. Distribution, biology, ecology and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, a major pest of citrus: A status report for China. International Journal of Pest Management 52(4): 343-35.
- Zhao Xue-Yuan, 1981. Citrus yellow shoot disease (huanglongbing) in China - a review. Proceedings of the International Society of Citriculture 1:466-469.

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Candidato para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

Tesis: AISLAMIENTO, PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE LA
PATOGENICIDAD DE CEPAS DE *Hirsutella citriformis* SPEARE
PARA EL CONTROL DE *Diaphorina citri* KUWAYAMA, VECTOR
DE LA ENFERMEDAD HUANGLONGBING DE LOS CÍTRICOS

Campo de estudio: Biotecnología

Datos Personales: Nacida en Cadereyta Jiménez N. L. el 13 de Octubre de 1958, hija de Eduardo Pérez Garza y María Victoriana González Garza.

Educación: Egresada de la Normal Miguel F. Martínez como Maestra en Educación Primaria. Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Químico Bacteriólogo Parasitólogo, titulada con Mención Honorífica. Maestría en Ciencias con Especialidad en Microbiología Industrial.

Experiencia Profesional: Maestra en educación Primaria por 28 años, Catedrático del Instituto Tecnológico Regional de los Mochis durante 1 año y Responsable del Bioterio en el área de Ciencia y Tecnología de la SE durante 1 año.

Pérez-González et al.: *Hirsutella* on *Diaphorina citri* in Mexico

Please address correspondence to:
Raúl Rodríguez-Guerra
Km. 31 Carretera Montemorelos-China,
CP 67400, General Terán, Nuevo León, México.
Phone: (+52) 826-2670260 ext. 109
rodriguez.raul@inifap.gob.mx

Mexican strains of *Hirsutella* isolated from *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae):
Morphologic and molecular characterization

Orquídea Pérez-González¹, Raúl Asael Rodríguez-Villarreal¹, J. Isabel López-Arroyo²,
María Guadalupe Maldonado-Blanco¹, Raúl Rodríguez-Guerra^{2*}.

¹ Instituto de Biotecnología, Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N, Facultad de
Ciencias Biológicas, UANL, Ciudad Universitaria, C.P. 66450 San Nicolás de los Garza
Nuevo León, México.

² INIFAP, Campo Experimental General Terán, AP No. 3. Km. 31 Carretera Montemorelos-
China, CP 67400, General Terán, Nuevo León, México.

* Corresponding author; E-mail: rodriguez.raul@inifap.gob.mx

De: Stelinski,Lukasz L [stelinski@ufl.edu]
Enviado el: lunes, 08 de diciembre de 2014 02:13 p.m.
Para: RODRIGUEZ GUERRA RAUL
CC: Waldemar Klassen
Asunto: Re: Manuscript

Dear Dr. Rodriguez:

I think that you have adequately addressed the reviewers' edits and comments.

Please submit a 'clean' final version of the manuscript without track changes to Dr. Klassen. I recommend accepting the manuscript for publication. Thank you for submitting your interesting work to Florida Entomologist. All the best, Lukasz

Radial growth, Sporulation, and Virulence of Mexican isolates of *Hirsutella citriformis*¹ against *Diaphorina citri*².

Orquídea Pérez-González², Raúl Rodríguez-Guerra³, J. Isabel López-Arroyo³, Carlos F. Sandoval-Coronado², María Guadalupe Maldonado-Blanco^{2*}

*Corresponding Author : Dr. María Guadalupe Maldonado-Blanco.

Instituto de Biotecnología Facultad de Ciencias Biológicas,

Universidad Autónoma de Nuevo León

San Nicolás de los Garza, Nuevo León Mexico,

Phone: + 52 81 83294000 ext. 6464

Fax: + 52 81 83294000 ext. 6415

Email: mgpemald@hotmail.com

¹ Hypocreales: Ophiocordycipitaceae.

² Hemiptera: Liviidae

³ Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. C.P. 66450, A .P. 414 y 2790,

⁴ INIFAP, Campo Experimental General Terán, Km. 31 Carretera Montemorelos-China, CP 67400, General Terán, Nuevo León, México.

SOUTHWESTERN ENTOMOLOGIST

Manuscript Review

MANUSCRIPT #2455

TITLE: Radial Growth, Sporulation, and Virulence of *Hirsutella citriformis* Mexican Isolates against *Diaphorina citri*

AUTHOR: Orquídea Pérez-González, Raúl Rodríguez-Guerra, J. Isabel López-Arroyo, Carlos F. Sandoval-Coronado, and María Guadalupe Maldonado-Blanco

___ Acceptable __XX__ Acceptable with Revision ___ Not Acceptable

Topics that might be considered in the review:

Is the manuscript appropriate to the field of the journal? **Yes**

Has the material been published previously, or is it being considered for publication elsewhere? **Probably not**

Are the methods clearly described? **No**

Is the work preliminary, inconclusive, or superficial? **Acceptable**

Do the data justify the conclusions? **Yes**

Are the results adequately analyzed by appropriate statistical methods? **Yes**

Are results compared with previous work? **Yes**

Does the work meet technical standards? **Almost**

Is there redundancy throughout the text including tables and figures? **No**

Are graphics clear? **Acceptable**

The manuscript after revision should be acceptable for publication. Comments and changes are on the manuscript and below.

CAPITULO DE LIBRO

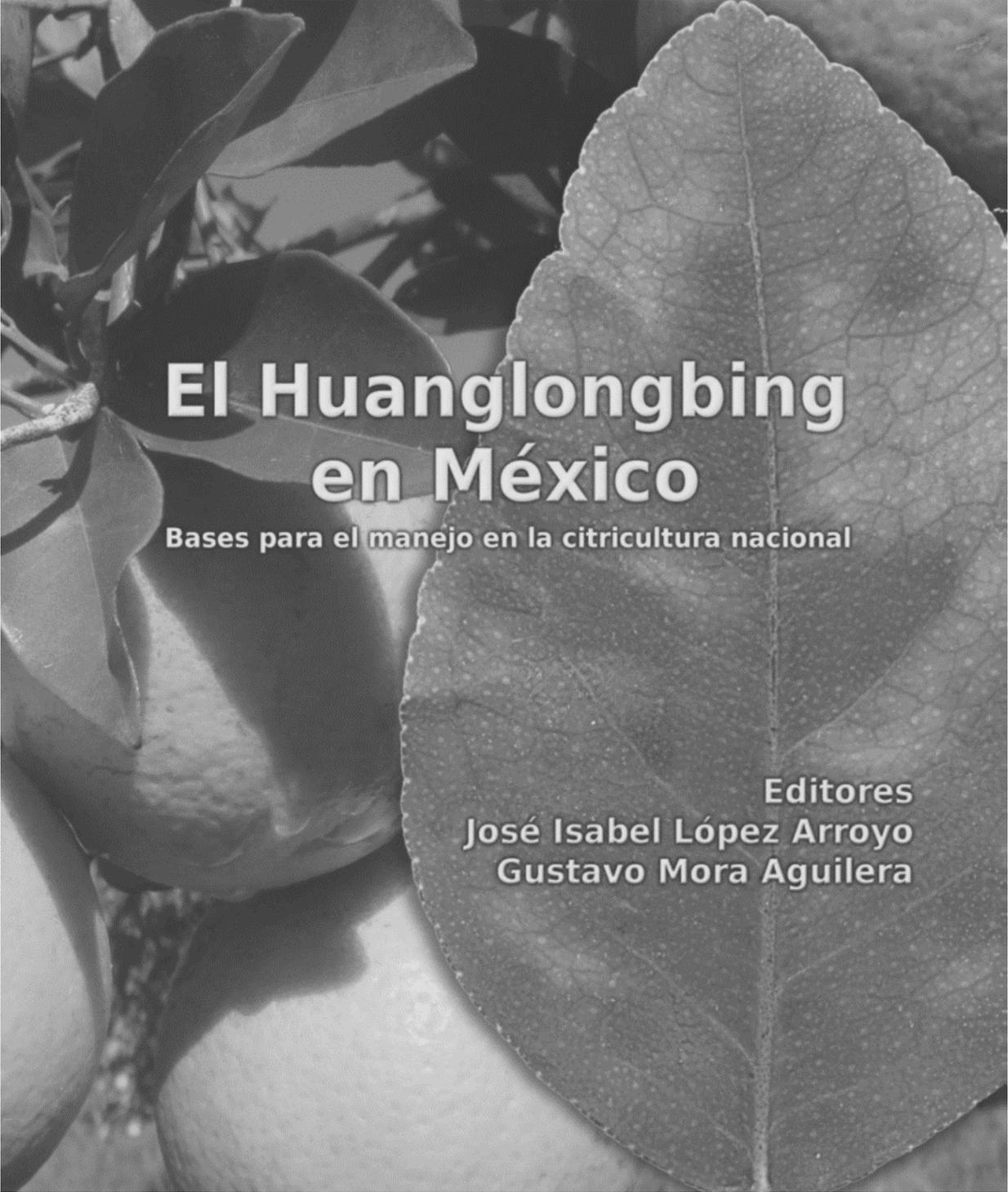
AISLADOS MEXICANOS DE *Hirsutella citriformis*

Orquídea Pérez-González¹, María Guadalupe Maldonado-Blanco², Raúl Rodríguez-Guerra³, Carlos Francisco Sandoval-Coronado⁴, José Isabel López-Arroyo⁵

^{1,2,4}Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. 66450 San Nicolás de los Garza, N.L., Méx. ³

⁵INIFAP, Campo Experimental General Terán. 67400 Gral. Terán, N.L., Méx.

orquideapg@hotmail.com



El Huanglongbing en México

Bases para el manejo en la citricultura nacional

**Editores
José Isabel López Arroyo
Gustavo Mora Aguilera**