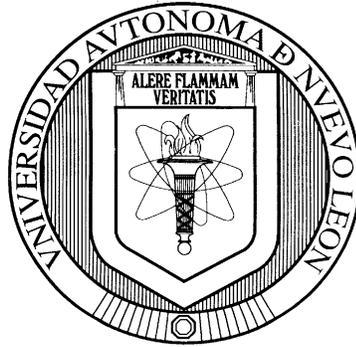


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EVALUACIÓN DE AISLADOS NATIVOS DE HONGOS  
ENTOMOPATÓGENOS DE ZONAS CITRÍCOLAS  
SOBRE *Diaphorina citri* Kuwayama  
(Hemiptera: Psyllidae)**

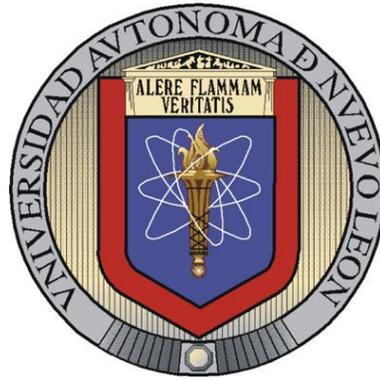
**Por**

**Q.B.P. FÁTIMA LIZETH GANDARILLA PACHECO**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
BIOTECNOLOGÍA**

**Noviembre 2012**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EVALUACIÓN DE AISLADOS NATIVOS DE HONGOS  
ENTOMOPATÓGENOS DE ZONAS CITRÍCOLAS  
SOBRE *Diaphorina citri* Kuwayama  
(Hemiptera: Psyllidae)**

**Por**

**Q.B.P. FÁTIMA LIZETH GANDARILLA PACHECO**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
BIOTECNOLOGÍA**

**Noviembre 2012**

**EVALUACIÓN DE AISLADOS NATIVOS DE HONGOS  
ENTOMOPATÓGENOS DE ZONAS CITRÍCOLAS  
SOBRE *Diaphorina citri* Kuwayama  
(Hemiptera: Psyllidae)**

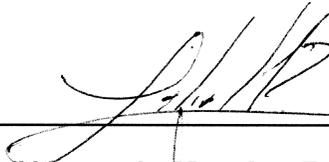
**Comité de Tesis**



**Dra. Isela Quintero Zapata**  
Director de Tesis



**Dr. Carlos Francisco Sandoval Coronado**  
Secretario



**Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos**  
Vocal 1



**Dra. Myriam Elías Santos**  
Vocal 2



**Dr. Luis J. Galán Wong**  
Vocal 3

## TABLA DE CONTENIDO

| Sección   | Página |
|---|--------|
| <b>AGRADECIMIENTOS</b> .....                          | i      |
| <b>DEDICATORIA</b> .....                              | iii    |
| <b>LUGAR DE TRABAJO</b> .....                         | v      |
| <b>LISTA DE TABLAS</b> .....                          | vi     |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....                         | vii    |
| <b>NOMENCLATURA</b> .....                             | ix     |
| <b>RESUMEN</b> .....                                  | xi     |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                 | xii    |
| 1. INTRODUCCIÓN .....                                 | 1      |
| 2. HIPÓTESIS .....                                    | 4      |
| 3. OBJETIVOS .....                                    | 4      |
| 3.1 Objetivo general .....                            | 4      |
| 3.2 Objetivos particulares .....                      | 4      |
| <b>4. ANTECEDENTES</b> .....                          | 6      |
| 4.1 <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama .....            | 6      |
| 4.1.1 Ubicación taxonómica .....                      | 6      |
| 4.1.2 Ciclo de vida .....                             | 6      |
| 4.1.3 Plantas hospedantes .....                       | 8      |
| 4.1.4 Huevo .....                                     | 9      |
| 4.1.5 Ninfas .....                                    | 9      |
| 4.1.6 Adulto .....                                    | 10     |
| 4.1.7 Distribución .....                              | 11     |
| 4.1.8. Daños .....                                    | 12     |
| 4.1.8.1 Daño directo .....                            | 12     |
| 4.1.8.2 Daño indirecto .....                          | 14     |
| 4.2 Huanglongbing (HLB) .....                         | 14     |
| 4.2.1 Agente causal .....                             | 14     |
| 4.2.2 Modo de infección .....                         | 15     |
| 4.2.3 Síntomas .....                                  | 15     |
| 4.2.4 Distribución .....                              | 16     |
| 4.3 Métodos de control .....                          | 17     |
| 4.3.1 Control químico .....                           | 17     |
| 4.3.2 Control biológico .....                         | 18     |
| 4.3.3.1 Depredadores .....                            | 18     |
| 4.3.3.2 Parasitoides .....                            | 20     |
| 4.3.3.3 Hongos entomopatógenos .....                  | 21     |
| 4.4 Generalidades de los hongos entomopatógenos ..... | 22     |
| 4.4.1 <i>Beauveria bassiana</i> .....                 | 23     |
| 4.4.1.1 Ubicación taxonómica .....                    | 24     |
| 4.4.1.2 Rango de hospederos .....                     | 24     |
| 4.4.1.3 Morfología .....                              | 25     |
| 4.4.2 <i>Isaria fumosorosea</i> .....                 | 25     |
| 4.4.2.1 Ubicación taxonómica .....                    | 26     |

|   |    |
|---|----|
| 4.4.2.2 Rango de hospederos .....   | 27 |
| 4.4.2.3 Morfología .....  | 27 |
| 4.4.3 <i>Metarhizium anisopliae</i> .....   | 28 |
| 4.4.3.1 Ubicación taxonómica .....  | 28 |
| 4.4.3.2 Rango de hospederos .....   | 29 |
| 4.4.3.3 Morfología .....  | 29 |
| 4.5 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos ....                            | 29 |
| 4.5.1 Adhesión de la espora a la cutícula del hospedero ...                           | 30 |
| 4.5.2 Germinación de la espora .....  | 30 |
| 4.5.3 Penetración del integumento .....   | 31 |
| 4.5.4 Penetración a través de cuerpos abiertos .....                                  | 33 |
| 4.5.5 Replicación en el hemocele .....  | 33 |
| 4.5.6 Dispersión de las esporas .....   | 34 |
| 4.6 Enzimas .....   | 35 |
| 4.6.1 Función de las enzimas durante el proceso de<br>infección .....                 | 35 |
| 4.6.2 Lipasas .....   | 36 |
| 4.6.3 Proteasas y Quitinasas .....  | 38 |
| 4.7 Producción de hongos entomopatógenos .....  | 40 |
| 4.7.1 Requerimientos nutricionales .....  | 41 |
| 4.7.2 Medios de cultivo .....   | 41 |
| 4.7.3 Tecnologías para la producción de hongos<br>entomopatógenos .....               | 42 |
| 4.7.3.1 Cultivos bifásicos .....  | 43 |
| 4.7.3.2 Cultivos líquidos agitados o fermentaciones<br>líquidas .....                 | 44 |
| 4.8 Actividad tóxica de hongos entomopatógenos sobre<br><i>Diaphorina citri</i> ..... | 45 |
| <b>5. MÉTODOS</b> .....   | 48 |
| 5.1 Reactivos y material biológico .....  | 48 |
| 5.2 Equipo .....  | 50 |
| 5.3 Estrategia experimental .....   | 50 |
| 5.4 Selección de medios de cultivo para la producción de<br>conidios en placa .....   | 53 |
| 5.4.1 Activación de las cepas .....   | 53 |
| 5.4.2 Inoculación e incubación de medios de producción...                             | 54 |
| 5.4.2.1 Evaluación de la producción de conidios .....                                 | 54 |
| 5.4.2.2 Evaluación del crecimiento micelial .....                                     | 54 |
| 5.4.3 Análisis Estadístico .....  | 55 |
| 5.5 Producción de conidios para bioensayos .....                                      | 55 |
| 5.5.1 Viabilidad .....  | 55 |
| 5.6 Cría de <i>Diaphorina citri</i> .....   | 56 |
| 5.7 Bioensayos con adultos de <i>D. citri</i> .....                                   | 56 |
| 5.7.1 Bioensayos preliminares con adultos de <i>D. citri</i> .....                    | 57 |
| 5.7.1.1 Aspersión directa a la plántula .....   | 57 |
| 5.7.1.2 Aspersión directa a los insectos .....  | 58 |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.7.2 Ensayos de supervivencia con adultos de <i>D. citri</i> .....       | 58        |
| 5.7.2.1 Aspersión directa a la plántula .....                             | 59        |
| 5.7.2.2 Aspersión directa a los insectos .....                            | 59        |
| 5.7.2.3 Análisis Estadístico .....  | 60        |
| 5.7.3 Bioensayo por contacto con adultos de <i>D. citri</i> .....         | 60        |
| 5.8 Bioensayos con ninfas de <i>D. citri</i> .....                        | 61        |
| 5.8.1 Bioensayos preliminares con ninfas de <i>D. citri</i> .....         | 61        |
| 5.8.2 Bioensayos por aspersión con ninfas de <i>D. citri</i> .....        | 62        |
| 5.8.2.1 Análisis estadístico .....  | 63        |
| 5.8.3 Bioensayos por método sumergido con ninfas de <i>D. citri</i> ..... | 63        |
| 5.9 Actividad enzimática en placa .....                                   | 64        |
| 5.9.1 Preparación de la suspensión de conidios .....                      | 64        |
| 5.9.2 Composición de los medios de cultivo .....                          | 65        |
| 5.9.2.1 Medio hidrólisis de caseína .....                                 | 65        |
| 5.9.2.2 Medio quitinasas .....  | 65        |
| 5.9.2.3 Medio Tween 20 .....  | 65        |
| 5.9.3 Inoculación e incubación de medios .....                            | 66        |
| 5.9.4 Medición de la actividad enzimática .....                           | 66        |
| 5.9.5 Interpretación de la actividad enzimática en medios sólidos .....   | 66        |
| 5.9.6 Análisis Estadístico .....  | 66        |
| 5.10 Producción de conidios en sustrato sólido .....                      | 67        |
| 5.10.1 Preparación del precultivo .....                                   | 67        |
| 5.10.2 Preparación e inoculación del sustrato .....                       | 67        |
| 5.10.2.1 Medición de la productividad del sustrato ....                   | 68        |
| 5.10.2.2 Pruebas de sobrevivencia .....                                   | 68        |
| 5.10.3 Análisis estadístico .....   | 68        |
| 5.11 Ensayos con insectos benéficos .....                                 | 69        |
| 5.11.1 Cría de insectos depredadores .....                                | 69        |
| 5.11.2 Preparación de la suspensión de conidios .....                     | 70        |
| 5.11.3 Bioensayos con <i>Hippodamia convergens</i> .....                  | 70        |
| 5.11.4 Bioensayos con <i>C. valida</i> y <i>E. punctinervis</i> .....     | 71        |
| <b>6. RESULTADOS</b> .....  | <b>72</b> |
| 6.1 Evaluación de la producción de conidios.....                          | 72        |
| 6.1.1 Producción de conidios por efecto del medio de cultivo .....        | 72        |
| 6.1.2 Producción de conidios entre los aislados y cepas....               | 72        |
| 6.2 Evaluación del crecimiento micelial.....                              | 73        |
| 6.2.1 Crecimiento micelial por efecto del medio de cultivo...             | 73        |
| 6.2.2 Crecimiento micelial entre los aislados y cepas.....                | 73        |
| 6.3 Viabilidad.....   | 78        |
| 6.4 Bioensayos con adultos de <i>Diaphorina citri</i> .....               | 78        |
| 6.4.1 Bioensayos preliminares con adultos de <i>D. citri</i> .....        | 78        |
| 6.4.1.1 Aspersión directa a la plántula .....                             | 78        |
| 6.4.1.2 Aspersión directa a los insectos .....                            | 79        |

|   |     |
|---|-----|
| 6.4.2 Ensayos de supervivencia con adultos de <i>D. citri</i> .....   | 80  |
| 6.4.2.1 Aspersión directa a la plántula .....   | 81  |
| 6.4.2.2 Aspersión directa a los insectos .....  | 82  |
| 6.4.3 Bioensayo por contacto con adultos de <i>D. citri</i> .....   | 84  |
| 6.5 Bioensayos con ninfas de <i>D. citri</i> .....  | 85  |
| 6.5.1 Bioensayos preliminares con ninfas de <i>D. citri</i> .....   | 85  |
| 6.5.2 Bioensayos por aspersión con ninfas de <i>D. citri</i> .....  | 86  |
| 6.5.3 Bioensayos por método sumergido con ninfas de <i>D. citri</i> .....   | 86  |
| 6.6 Actividad enzimática en placa .....   | 89  |
| 6.6.1 Relación de la mortalidad de <i>D. citri</i> con la actividad enzimática.....   | 89  |
| 6.7 Producción de conidios en sustrato sólido .....   | 93  |
| 6.7.1 Pruebas de sobrevivencia .....  | 94  |
| 6.8 Ensayos con insectos benéficos .....  | 96  |
| 6.8.1 Bioensayos con <i>Hippodamia convergens</i> .....   | 96  |
| 6.8.2 Bioensayos con <i>Ceraeochrysa valida</i> y <i>Eremochrysa punctinervis</i> .....   | 97  |
| 6.8.2.1 Bioensayos con larvas de tercer estadio de <i>E. punctinervis</i> .....   | 97  |
| 6.8.2.2 Bioensayos con larvas de primer estadio de <i>C. valida</i> .....   | 98  |
| 6.8.2.3 Bioensayos con larvas de segundo estadio de <i>C. valida</i> .....  | 98  |
| <b>7. DISCUSIÓN</b> .....   | 100 |
| <b>8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....  | 115 |
| <b>APENDICES</b> .....  | 119 |
| Biología de <i>Diaphorina citri</i> .....   | 119 |
| Distribución de <i>D. citri</i> .....   | 120 |
| Daño directo causado por <i>D. citri</i> .....  | 122 |
| Daño indirecto causado por <i>D. citri</i> .....  | 123 |
| Distribución mundial del Huanglongbing.....   | 124 |
| Insecticidas y otros productos de origen químico seleccionados por causar alta mortalidad de <i>D. citri</i> . Experimentos regionales en la citricultura de México en el año 2010..... | 125 |
| Depredadores de <i>D. citri</i> .....   | 128 |
| Parasitoides de <i>D. citri</i> .....   | 130 |
| Hongos entomopatógenos que infectan a <i>D. citri</i> .....   | 131 |
| Morfología de <i>Beauveria bassiana</i> .....   | 132 |
| Morfología de <i>Isaria fumosorosea</i> .....   | 133 |
| Morfología de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....   | 134 |
| <b>LITERATURA CITADA</b> .....  | 135 |
| <b>RESUMEN BIOGRÁFICO</b> .....   | 151 |

## AGRADECIMIENTOS

### A las Instituciones:

Al **Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

Al **Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (IB-FCB, UANL)** por haberme recibido en sus instalaciones y darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente.

Al **Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)**, específicamente al Laboratorio de Investigación en Control Biológico del Campo Experimental General Terán, Nuevo León por las facilidades otorgadas para la realización de los bioensayos.

### A las personas:

A la **Dra. Isela Quintero Zapata** por su valiosa asesoría en la dirección de esta investigación, por su apoyo incondicional a todas mis ideas y proyectos en el desarrollo de este trabajo, por creer en mí como profesional y como ser humano y lo más importante, por el honor de considerarme su amiga, gracias maestra.

A la **Dra. Myriam Elías Santos** por haber formado parte de mi comité tutorial y de tesis, por su apoyo durante esta investigación y por su amistad.

A la **Dra. Lilia H. Morales Ramos** por su apoyo durante esta investigación y por formar parte de mi comité de tesis.

A la **Dra. Katiushka Arévalo Niño** por sus positivos y valiosos comentarios hacia este trabajo.

Al **Dr. Luis J. Galán Wong** por formar parte de mi comité de tesis, así como por sus sugerencias y aportaciones para esta investigación.

Al **Dr. Carlos F. Sandoval Coronado** por haber formado parte de mi comité tutorial y de tesis, así como por sus valiosos comentarios y observaciones para esta investigación.

Al **Dr. José I. López Arroyo** por las facilidades otorgadas para la realización de los bioensayos y sugerencias para esta investigación.

Al **Dr. Raúl Rodríguez Guerra** por sus valiosos comentarios y sugerencias para esta investigación.

A todo el L6 especialmente a la **Biol. Eugenia G. Ortiz Lechuga, Ricardo Pérez, Ileana Castro, Biol. Héctor D. Nava González, Q.B.P Claudia B. López Alvarado** y a los que alguna vez pasaron por este laboratorio: **Q.B.P Aldo E. Salcedo Morales, Julián, Wisho, Rafa, Dinora, Gaby y Mariana**, por el tiempo que compartimos, su apoyo y compañerismo.

A todo el personal que conforma el Instituto de Biotecnología FCB-UANL por las facilidades otorgadas para el desarrollo de esta investigación.

A mis compañeras en el Campo experimental de General Terán N.L. **Yessy, Jimena, Erika, Sarahi, Ivonne, Lucia, Gaby y Reyna**, por su apoyo durante mi estancia y especialmente para **María Luisa Rodríguez Ibarra** por su apoyo incondicional para la realización de los bioensayos, y por brindarme su amistad.

A todo el personal administrativo y de investigación del Campo Experimental del INIFAP en General Terán, N.L por las facilidades otorgadas para el desarrollo de esta investigación.

A todo el personal de la subdirección de posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL por las facilidades otorgadas para el desarrollo de este trabajo.

Y a todas las personas que de alguna u otra manera contribuyeron con la realización de este trabajo, muchas gracias!!

## DEDICATORIA

### Dios:

Gracias por darme el regalo más maravilloso que existe... *la vida*  
 Gracias por darme salud para cumplir cada uno de los objetivos que me he propuesto  
 Gracias por darme una familia en la que crecí y de la cual aprendí lo más valioso del mundo... *el amor incondicional*

### A mi madre: **Sra. Ma. Isabel Pacheco Fernández**

*La mujer más valiente y excepcional que conozco*

Gracias por darme la vida y porque desde que llegue a este mundo nunca dejaste de luchar para que yo sea la persona que soy ahora, porque nunca te dejaste vencer a pesar de las adversidades...  
 Gracias por enseñarme con tu ejemplo que el trabajo es la mejor manera de trascender en la vida...  
 Gracias por ser mi mamá, te quiero mucho mami...

### A mi hermana **Magdalena Arisveth Montoya Pacheco**

*Mi hermanita*

Mi única hermana, sabes que aunque nuestra visión de la vida sea distinta te quiero mucho y deseo lo mejor del mundo para ti...  
 Gracias por los momentos compartidos y por todo lo que de alguna u otra manera hemos aprendido en el camino de la vida...  
 Que Dios te bendiga siempre...

### A mi abuelo: † **Sr. J. Dimas Pacheco Hernández**

*El mejor abuelo y padre que pude haber tenido*

Siempre pensé que cuando llegara esta momento estaría a mi lado, como lo estuvo hasta el último día, se que desde el cielo está feliz porque este también era su sueño, quiero que sepa que todos los esfuerzos y sacrificios valieron la pena...  
 Gracias por su ejemplo, por su cariño, por sus consejos y por haber cuidado de mí siempre, sé que algún día nos volveremos a ver...  
 Gracias por todo lo que hizo por mí, lo quiero mucho, y lo extraño aun más...

A mi abuela **Sra. María del Rosario Vda. De Pacheco**

*La mejor abuela del mundo*

Que puedo decirte, que estoy feliz porque Dios me permite la dicha de que compartas este momento conmigo, más que solo mi abuela, eres como mi segunda madre, por tu dedicación, por tu esfuerzo, nunca olvidare todo lo que has hecho por mí...

Gracias por tu ejemplo, por tus consejos, por tu cariño, por estar conmigo y apoyarme siempre, te quiero mucho que Dios te bendiga eternamente...

Al amor de mi vida: **Alberto de Jesús Ríos Torres**

*El mejor hombre que he conocido*

Gracias por llegar a mi vida, y transformarla llenándola de sueños, ilusiones y felicidad...

Gracias por enseñarme tanto en tan poco tiempo...

Gracias por estar siempre conmigo, por apoyarme y comprenderme, pero sobre todo, por el inmenso amor que sientes por mí, al igual que el que yo siento por ti, te amo...

Tu amor y dedicación hacia mí es lo más maravilloso de mi vida, y le pido a Dios que me permita compartir mi vida contigo y estar juntos eternamente...

Ahora sabes que eres el hombre que me salvo en todas las formas en que una persona puede ser salvada...

I love you so much...

Ustedes son mi familia y les dedico este trabajo porque sin su apoyo no hubiera sido posible llegar hasta aquí, son mi fuerza, mi motor, mis ganas de vivir y de seguir adelante... los amo

## LUGAR DE TRABAJO



El presente trabajo se desarrollo en el laboratorio L6 del Instituto de Biotecnología, FCB-UANL y en el Laboratorio de Investigación en Control Biológico del Campo Experimental General Terán, Nuevo León del INIFAP.



## LISTA DE TABLAS

| Tabla   | Página |
|---|--------|
| I. Estadios ninfales de <i>Diaphorina citri</i> .....   | 10     |
| II. Hongos entomopatógenos aislados en suelo donde se cultivan cítricos en diferentes estados de México.....  | 52     |
| III. Composición de los medios de producción de conidios en placa.....  | 53     |
| IV. Producción promedio de conidios por efecto de los diferentes medios de cultivo a los 14 días de incubación bajo condiciones de laboratorio ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).....  | 74     |
| V. Producción promedio de conidios por aislado y/o cepa a los 14 días de incubación bajo condiciones de laboratorio ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).....   | 75     |
| VI. Evaluación del crecimiento micelial promedio por efecto de los diferentes medios de cultivo a los 14 días de incubación bajo condiciones de laboratorio ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).....   | 76     |
| VII. Evaluación del crecimiento micelial promedio por aislado y/o cepa a los 14 días de incubación bajo condiciones de laboratorio ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).....  | 77     |
| VIII. Mortalidad de <i>D. citri</i> por aislados y/o cepas de hongos entomopatógenos por dos métodos diferentes de inoculación bajo condiciones de laboratorio ( $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , $60 \pm 5\%$ H.R., 16:8 h L:O) .....          | 83     |
| IX. Efecto de conidios de aislados nativos y cepas de colección de hongos entomopatógenos sobre ninfas de <i>Diaphorina citri</i> bajo condiciones de laboratorio ( $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , $60 \pm 5\%$ H.R., 16:8 h L: O.).....      | 87     |
| X. Índice enzimático entre los diferentes aislados y cepas de hongos entomopatógenos a las 120 h de incubación bajo condiciones de laboratorio, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .....  | 92     |
| XI. Estabilidad de los conidios de <i>B. bassiana</i> e <i>I. fumosorosea</i> almacenados a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante doce semanas.....   | 95     |
| XII. Mortalidad promedio de <i>Eremochrysa punctinervis</i> por aislados de <i>B. bassiana</i> y cepas de <i>I. fumosorosea</i> a los 26 días de incubación bajo condiciones de laboratorio, $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; 12:12 h L: O..... | 97     |
| XIII. Mortalidad promedio de <i>Ceraeochrysa valida</i> por aislados de <i>B. bassiana</i> y cepas de <i>I. fumosorosea</i> a los 26 días de incubación bajo condiciones de laboratorio, $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; 12:12 h L: O.....     | 98     |
| XIV. Mortalidad promedio de <i>Ceraeochrysa valida</i> por aislados de <i>B. bassiana</i> y cepas de <i>I. fumosorosea</i> a los 26 días de incubación bajo condiciones de laboratorio, $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; 12:12 h L: O.....      | 99     |

## LISTA DE FIGURAS

| Figura  | Página |
|---|--------|
| 1. Etapas de desarrollo de <i>Diaphorina citri</i> .....  | 8      |
| 2. Esquema del desarrollo de un hongo entomopatógeno.....   | 35     |
| 3. Representación de la interacción entre las enzimas extracelulares y la degradación de la cutícula de los insectos.....   | 39     |
| 4. Representación esquemática de la estrategia experimental.....  | 51     |
| 5. Mortalidad de <i>D. citri</i> por aislados y/o cepas de <i>B. bassiana</i> , <i>M. anisopliae</i> e <i>I. fumosorosea</i> mediante el método de aspersión directa a la plántula bajo condiciones de laboratorio, 24°C; 52% H.R; 16:8 h L: O. Líneas en las barras indican el error estándar.....   | 79     |
| 6. Mortalidad de <i>D. citri</i> por aislados y/o cepas de <i>B. bassiana</i> , <i>M. anisopliae</i> e <i>I. fumosorosea</i> mediante el método de aspersión directa a los insectos bajo condiciones de laboratorio, 24°C; 52% H.R; 16:8 h L: O. Líneas en las barras indican el error estándar.....  | 80     |
| 7. Porcentaje de supervivencia de <i>D. citri</i> en arenas experimentales sin manipulación del insecto, bajo condiciones de laboratorio, 26±1°C; 60±5% H.R; 16:8 h L: O. Líneas en las barras indican el error estándar.....   | 81     |
| 8. Mortalidad de <i>D. citri</i> por dos diferentes métodos de inoculación. A) Adultos de <i>D. citri</i> micosados por el aislado HIB-19 de <i>I. fumosorosea</i> mediante el método de aspersión directa a la plántula y B) Adultos de <i>D. citri</i> micosados por el aislado HIB-32 de <i>I. fumosorosea</i> mediante el método de aspersión directa a los insectos..... | 82     |
| 9. Mortalidad de <i>D. citri</i> por aislados y/o cepas de <i>B. bassiana</i> , <i>I. fumosorosea</i> , <i>M. anisopliae</i> e <i>H. citriformis</i> bajo condiciones de laboratorio, 26±2°C; 52% H.R; 16 h L: O. Líneas en las barras indican el error estándar.....   | 84     |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 10. | Mortalidad de ninfas de <i>D. citri</i> causada por aislados y/o cepas de <i>B. bassiana</i> , <i>M. anisopliae</i> e <i>I. fumosorosea</i> bajo condiciones de laboratorio, 26±2°C; 60±5% H.R; 16:8 h L:O. Líneas en las barras indican el error estándar.....   | 85 |
| 11. | Mortalidad de ninfas de <i>D. citri</i> causada por aislados de <i>B. bassiana</i> bajo condiciones de laboratorio, 26±2°C; 60±5% H.R; 16:8 h L: O.....   | 88 |
| 12. | Ninfas de <i>D. citri</i> micosadas por <i>B. bassiana</i> . A) HIB-2, B) HIB-3, C) HIB-4 y D) HIB-5 mediante el método de sumergido.....   | 88 |
| 13. | Actividad enzimática en placa. A) Actividad lipolítica en medio Tween 20 del aislado HIB-10 de <i>B. bassiana</i> , B y C) Actividad quitinolítica en medio quitinasas de los aislados HIB-1 y HIB-19 de <i>B. bassiana</i> e <i>I. fumosorosea</i> y D) Actividad proteolítica en medio hidrólisis de caseína del aislado HIB-6 de <i>B. bassiana</i> . Nótese el halo de inhibición característico en medios de cultivo sólido..... | 93 |
| 14. | Producción de conidios entre los diferentes aislados de <i>B. bassiana</i> e <i>I. fumosorosea</i> a los 14 días de incubación bajo condiciones de laboratorio, 25±2°C. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa según la prueba de Scheffé ( $p \leq 0.05$ ). Promedio ± DE= (9.50 x 10 <sup>8</sup> ±0.24 conidios g <sup>-1</sup> de arroz). Líneas en las barras indican el error estándar. ....     | 94 |
| 15. | Conidios germinados del aislado HIB-4 de <i>B. bassiana</i> . Nótese la formación del tubo germinativo, tan largo como la mitad del diámetro de la espora característico de una espora germinada.....   | 95 |
| 16. | Mortalidad de <i>H. convergens</i> por aislados de <i>B. bassiana</i> y cepas de <i>I. fumosorosea</i> a los 26 días de incubación bajo condiciones de laboratorio, 28±1°C; 12:12 h L: O. ....  | 96 |

## NOMENCLATURA

|   |  |
|---|--|
| ADN                                       | Acido desoxirribonucleico  |
| ARN                                       | Acido ribonucleico   |
| $\alpha$                                  | Alfa   |
| ANOVA                                     | Análisis de varianza   |
| &   | ampersand  |
| ARSEF                                     | Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungi |
| $\beta$                                   | beta   |
| $^{\circ}\text{C}$                        | Grados centigrados   |
| $\text{Ca}^{+2}$                          | Ion calcio   |
| $\text{CaCl}_2$                           | Cloruro de calcio  |
| $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  | Cloruro de calcio dihidratado                                      |
| $\text{CL}_{50}/\text{DL}_{50}$           | Concentración letal media/ Dosis letal media                       |
| $\text{CL}_{99}$                          | Concentración letal 99 %   |
| $\text{cm}^3$                             | Centímetro cubico  |
| cm  | Centímetro   |
| DE  | Desviación estándar  |
| EPPO                                      | European and Mediterranean Plant Protection Organization           |
| FCB                                       | Facultad de Ciencias Biológicas                                    |
| $^{\circ}$                                | Grados   |
| GlcNAc                                    | N-acetil-D-glucosamina   |
| $\gamma$                                  | Gamma  |
| g   | Gramo  |
| h   | horas  |
| HLB                                       | Huanglongbing  |
| H.R.                                      | Humedad relativa   |
| ITS                                       | espaciador interno transcrito                                      |
| KCl                                       | Cloruro de potasio   |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | Fosfato de potasio monobasico                                      |
| $\text{KNO}_3$                            | Nitrato de potasio   |
| L.  | Linneo   |
| L   | Litro  |
| lbs.                                      | Libras   |
| $\log_{10}$                               | Logaritmo base 10  |
| (L:O)                                     | Luz:oscuridad  |
| +   | Mas  |
| $\text{Mg}^{+2}$                          | Ion magnesio   |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | Sulfato de magnesio heptahidratado                                 |
| >   | Mayor que  |
| mL  | Mililitro  |
| mm  | Milímetro  |
| $\text{mm}^2$                             | Milímetro cuadrado   |
| msnm                                      | Metros sobre el nivel del mar                                      |
| $\leq$                                    | Menor o igual que  |

|   |   |
|---|---|
| NaCl  | Cloruro de sodio  |
| NAGasa  | N-acetilglucosamidasas  |
| NaNO <sub>3</sub>                               | Nitrato de sodio  |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Sulfato de amonio   |
| NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | Fosfato de amonio monobasico  |
| PDA   | Papa dextrosa agar  |
| %   | Porcentaje  |
| pH  | Potencial de hidrogeno  |
| rDNA  | Acido desoxirribonucleico recombinante                                |
| rpm   | Revoluciones por minuto   |
| SENASICA  | Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria     |
| SINAVIMO  | Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas        |
| <i>spp</i>                                      | Especies  |
| TL <sub>50</sub>                                | Tiempo letal medio  |
| UANL  | Universidad Autónoma de Nuevo León                                    |
| USDA-ARS  | United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service |
| µm  | Micra   |
| µL  | Microlitro  |
| v/v   | Volumen/volumen   |

## RESUMEN

*Diaphorina citri* es el vector de una de las enfermedades más devastadoras a nivel mundial que afecta exclusivamente a plantas del género *Citrus* y *Murraya*, esta patología es conocida como Huanglongbing, la cual afecta la calidad de los frutos e incluso puede ocasionar la pérdida total de áreas cultivadas con cítricos. Debido a que *D. citri*, se encuentra presente en México es necesario buscar alternativas para controlar su peligrosa diseminación. Entre las alternativas para tratar la problemática que representan las plagas de cítricos y el uso desmedido de plaguicidas, se encuentra el control biológico, el cual ha sido aplicado exitosamente y en el caso de la citricultura, se consideran a los hongos entomopatógenos como uno de los grupos con potencial para el manejo de plagas. Por lo cual en el presente trabajo se evaluaron 33 aislados de hongos entomopatógenos provenientes de suelo de cultivos citrícolas y ocho cepas de colección GHA, Asdel 139, A-48 y A-44 (*B. bassiana*), Pfr-612 y Pfr-114 (*I. fumosorosea*), Met (*M. anisopliae*) y Hir-1 (*H. citrififormis*) para determinar su patogenicidad sobre ninfas y adultos de *D. citri*, así mismo se evaluó la producción de conidios en placa en cinco diferentes medios de cultivo, actividad enzimática (lipasa, proteasa y quitinasa) y producción en grano de arroz (*Oryza sativa* L.) como sustrato sólido. Finalmente, se realizaron ensayos de inocuidad con los insectos depredadores *Ceraeochrysa valida*, *Eremochrysa punctinervis* e *Hippodamia convergens*. Dentro de los resultados obtenidos, para los bioensayos por aspersión con adultos de *D. citri* los aislados HIB-19 y HIB-32 (*I. fumosorosea*) y HIB-24 (*B. bassiana*) fueron los más efectivos en inducir mortalidad. Mientras que en los bioensayos por contacto con adultos del psílido la cepa Pfr-114 causó hasta un 100% de mortalidad. Respecto a los bioensayos por aspersión con ninfas de *D. citri* la cepa Pfr-612 mostró el mayor porcentaje de mortalidad (84.26%), por otra parte en los bioensayos por sumergido con ninfas, los aislados HIB-2, HIB-3, HIB-4 y HIB-5 (*B. bassiana*) mostraron un 100% de mortalidad. Con respecto a la producción en placa el aislado HIB-4 (*B. bassiana*) presentó la más alta concentración de conidios mL<sup>-1</sup>, mientras que la cepa Met presentó el mayor crecimiento micelial. Respecto a la actividad quitinasa el aislado HIB-19 presentó el mayor índice enzimático (1.50), mientras que no existió relación entre la actividad enzimática (lipasa, quitinasa y proteasa) y la mortalidad de ninfas y adultos de *D. citri*. Para la producción de conidios en grano de arroz el valor máximo (1.77x10<sup>9</sup> conidios g<sup>-1</sup>) se registró para el aislado HIB-4. Finalmente en los ensayos de inocuidad con los insectos benéficos que atacan a *D. citri* en su estadio ninfal, la cepa Pfr-114 presentó el valor mínimo de mortalidad para *H. convergens*. Respecto a los crisopidos en larvas de tercer estadio de *E. punctinervis* el valor mínimo de mortalidad se registró para el aislado HIB-5, mientras que para larvas de primer y segundo estadio de *C. valida* el valor mínimo de mortalidad se registro para los aislados HIB-4 y HIB-5, respectivamente. El contar con agentes microbianos como alternativa para el control de *D. citri*, es de vital importancia ya que permitirá alternar a éstos microorganismos con el uso extensivo de insecticidas convencionales, logrando así un mejor manejo de la posible resistencia del insecto mediante el uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico, debido a la facilidad para producirlos masivamente lo cual constituye una ventaja sobresaliente, ya que en el país existen laboratorios comerciales que podrían involucrarse inmediatamente en la producción y distribución de los mismos, lo cual generará esquemas de control del psílido con menor riesgo de efectos colaterales en la ecología de las áreas citrícolas.

## ABSTRACT

*Diaphorina citri* is the vector of one of the most devastating diseases worldwide which affects only plants of the genus *Citrus* and *Murraya*, this condition is known as Huanglongbing, which affects the quality of the fruits and can even result in total loss of areas cultivated with citrus. Because *D. citri* is present in Mexico is necessary to find alternatives to control its spread dangerous. Among the alternatives to treat the problems posed by pests of citrus and the excessive use of pesticides, we found with the biological control, which has been successfully applied and in the case of the citriculture, can be consider to the entomopathogenic fungi as one of the groups with potential for pest management. Therefore in the present study we evaluated 33 isolates of entomopathogenic fungi from citrus crop soil and eight strains of collection, GHA, Asdel 139, A-48 and A-44 (*B. bassiana*), Pfr-114 and Pfr-612 (*I. fumosorosea*), Met (*M. anisopliae*) and Hir-1 (*H. citriformis*) for determining its pathogenicity on *D. citri* nymphs and adults, also was evaluated in the production of conidia plate in five different culture media, enzymatic activity (lipase, protease and chitinase) and the production on grain rice (*Oryza sativa* L.) as a solid substrate. Finally, safety tests were conducted with the predatory insects *Ceraeochrysa valida*, *Eremochrysa punctinervis* and *Hippodamia convergens*. Among the results obtained, the bioassays for spraying adult *D. citri* the isolates HIB-19 and HIB-32 (*I. fumosorosea*) and HIB-24 (*B. bassiana*) were the most effective in inducing mortality. While in the bioassays by contact with adults of the psyllid, the strain Pfr-114 caused up to 100% mortality. Regarding spray bioassays with nymphs of *D. citri* the strain Pfr-612 showed the highest mortality rate (84.26%), on the other hand in bioassays by submerged with nymphs, the isolates HIB-2, HIB-3, HIB-4 and HIB-5 (*B. bassiana*) showed 100% mortality. With regard to production in plate, the isolated HIB-4 (*B. bassiana*) had the highest concentration of conidia mL<sup>-1</sup>, while the Met strain showed the highest mycelial growth. Regarding the chitinase activity, the isolated HIB-19 enzyme had the highest enzymatic index (1.50), whereas there was no relationship between the enzyme activity (lipase, protease and chitinase) and mortality of nymphs and adults of *D. citri*. For production of conidia on rice grain the maximum value (1.77x10<sup>9</sup> conidios g<sup>-1</sup>) was recorded for the isolated HIB-4. Finally in safety trials with beneficial insects that attack *D. citri* in its nymphal stage, Pfr-114 strain showed the lowest value of mortality for *H. convergens*. Regarding the lacewings, in third instar larvae of *E. punctinervis* the minimum value of mortality was recorded for the isolated HIB-5, while for the first and second larval stage *C. valida* the minimum value of mortality was recorded for the isolated HIB-4 and HIB-5, respectively. Having alternative microbial agents for the control of *D. citri*, is vital as it will allow to alternate these microorganisms with the use extensive of conventional insecticides, to achieve better management of the insect possible resistance using entomopathogenic fungi as biological control agents, because of the ease to produce them mass which is an outstanding advantage, since the country has commercial laboratories that could be involved immediately in the production and distribution of them, thus generating schemes for the psyllid control with less risk of side effects on the ecology of citrus areas.

## 1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la citricultura representa una de las industrias más importantes en el área frutícola, ya que tan solo para la temporada 2011-2012 la producción global de cítricos se estimó en un total de 85,357 millones de toneladas métricas de las cuales el 59.87 % corresponde a naranjas, 26.50 % a mandarinas y tangerinas, el 7.27 % a limas y limones y el 6.35 % a toronjas (USDA, 2012).

Para México esta industria representa una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura nacional, ya que la superficie establecida en 23 estados de la república abarca 549 mil hectáreas de las cuales el 61 % corresponde a naranja, 19 % a limones variedades mexicano y persa, y el 20 % a toronjas, mandarinas y tangerinas. En promedio, la producción anual se estima en 7 millones de toneladas de fruta con un valor de 10,206 millones de pesos, una exportación de fruta con un valor de 322 millones de dólares, la exportación de jugo de 225 millones de dólares y una exportación de aceite de 27 millones de dólares, lo cual sitúa a nuestro país como el cuarto productor a nivel mundial de cítricos (SENASICA, 2012).

Sin embargo, los cítricos son los frutales que probablemente albergan la mayor cantidad de plagas y enfermedades como la canchrosia de los cítricos, muerte regresiva de los cítricos, Stubborn, gomosis, fumagina, psorosis, tristeza de los cítricos, entre otras, las cuales reducen la producción, calidad del fruto y muchas veces causan la muerte de los árboles. Entre los grupos de microorganismos patógenos que afectan a los cítricos se encuentran bacterias (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*), fitoplasmas, spiroplasmas (*Spiroplasma citri*), hongos (*Phytophthora* spp., *Capnodium* spp., entre otros), además de virus (psorosis de los cítricos, virus de la tristeza de los cítricos) y viroides (Exocortis, viroide de la caquexia).

Anualmente, los cítricos establecidos en el país son atacados por al menos 74 especies de artrópodos perjudiciales, como la escama roja de California (*Aonidiella aurantii*; Hemiptera: Diaspididae), diversas especies de mosca blanca (mosquita blanca lanuda, *Aleurothrixus floccosus*; mosquita de los cítricos, *Tetrалеurodes ursorum*; mosca prieta, *Aleurocanthus woglumii*; Hemiptera: Aleyrodidae), ácaro de Texas (*Eutetranychus banksi*; Acari: Tetranychidae), negrilla o arador (*Phyllocoptruta oleivor*; Acari: Eriophyidae), trips (*Scirtothrips citri*, Thysanoptera: Thripidae), minador de la hoja (*Phyllocnistis citrella*, Lepidoptera: Gracillariidae), mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens*, Diptera: Tephritidae) y el pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricida*, Hemiptera: Aphididae), de los cuales la negrilla o arador, la mosca mexicana de la fruta, mosca prieta, diversas especies de mosca blanca, trips y el pulgón café de los cítricos representan comúnmente las especies de mayor importancia (López-Arroyo *et al.*, 2004, <http://www.concitver.com>).

En México se encuentra desde el 2002, *Diaphorina citri* el vector de una de las enfermedades más devastadoras de los cítricos alrededor del mundo, esta patología es conocida como Huanglongbing (HLB), la cual afecta la calidad de los frutos provocando que no sean útiles para consumo humano e incluso puede ocasionar la pérdida total de áreas cultivadas con cítricos.

El agente causal de esta enfermedad es *Candidatus Liberibacter asiaticus*, una bacteria limitada al floema, la cual es transmitida y diseminada por este insecto. El HLB fue detectado en Julio de 2009, en Tizimín, Yucatán; en ese mismo año se detectó su presencia en Quintana Roo, Nayarit y Jalisco; para el año 2010 se encontró en Campeche, Colima, Sinaloa y Michoacán, y durante 2011 en los estados de Baja California Sur, Chiapas e Hidalgo, lo cual representa un problema serio para la citricultura ante la posibilidad del desarrollo de epidemias severas que impliquen el deterioro de esta

importante actividad económica (López-Arroyo *et al.*, 2009; SENASICA, 2012).

Una alternativa a la problemática que representan las plagas de cítricos y al uso desmedido de plaguicidas, la constituye el uso del control biológico, el cual ha sido aplicado exitosamente contra diversas plagas en el país (Rodríguez y Arredondo, 2007); sin embargo, en el caso de la citricultura, existe aún una gran cantidad de especies plagas en las cuales es posible aplicar agentes de control biológico; de éstos, se consideran a los entomopatógenos como uno de los grupos con potencial para el manejo de plagas.

Debido a la seria amenaza que representa *Diaphorina citri* para la producción citrícola del país, en este trabajo se plantea evaluar la patogenicidad de diferentes cepas nativas de hongos entomopatógenos provenientes de muestras de suelo de cultivos citrícolas, para determinar su potencial como controladores del psílido asiático de los cítricos.

## 2. HIPÓTESIS

Los aislados nativos de la zona citrícola de México de hongos entomopatógenos pertenecientes a *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae* son patógenos al psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

Evaluar la patogenicidad de los aislados nativos de hongos entomopatógenos de *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae* sobre el psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri*.

### 3.2 Objetivos particulares

1. Seleccionar el medio de cultivo para la producción de conidios en placa de los diferentes aislados nativos y cepas de colección de *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae*.

2. Realizar bioensayos preliminares sobre adultos y ninfas de *Diaphorina citri* con los diferentes aislados nativos y cepas de colección de hongos entomopatógenos.

3. Estandarizar un método de bioensayo para evaluar las diferentes aislados nativos y cepas de colección de hongos entomopatógenos sobre adultos y ninfas de *Diaphorina citri*.

4. Evaluar la actividad enzimática en placa (lipasa, quitinasa y proteasa) entre los diferentes aislados nativos y cepas de colección de hongos entomopatógenos.

5. Producir conidios en sustrato sólido (*Oryza sativa* L.) del aislado (s) y/o cepa (s) con mayor potencial para el control de *Diaphorina citri*.

6. Realizar ensayos con insectos depredadores no-blanco (*Hippodamia convergens*, *Ceraeochrysa valida* y *Eremochrysa punctinervis*) que atacan a *Diaphorina citri*, para evaluar la inocuidad de los aislados y/o cepas que presentaron mayor mortalidad sobre ninfas o adultos del psílido asiático de los cítricos.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 *Diaphorina citri* Kuwayama

*Diaphorina citri* (= *Euphalarus citri*) Kuwayama 1908 fue descrito a partir de cítricos en Shinchiku, Taiwán en 1907 y publicado en un volumen doble en 1908. Las especies de *Diaphorina* usualmente son separadas en base al patrón de maculación en las alas anteriores y la forma de los conos genales. *Diaphorina citri* tiene un patrón distinto en las alas anteriores y se puede distinguir con facilidad de la mayoría de otras especies de psílidos que afectan a los cítricos y sus relativos (Halbert and Manjunath, 2004).

#### 4.1.1 Ubicación taxonómica

|                 |                                       |
|-----------------|---------------------------------------|
| Super reino     | Eukaryota                             |
| Reino           | Metazoa                               |
| Filum           | Artropoda                             |
| Superclase      | Hexapoda                              |
| Clase           | Insecta                               |
| Sub-clase       | Neoptera                              |
| Infra clase     | Paraneoptera                          |
| Orden           | Hemíptera                             |
| Super Familia   | Psylloidea                            |
| Familia         | Psyllidae                             |
| Genero          | <i>Diaphorina</i>                     |
| Especie         | <i>citri</i>                          |
| Nombre binomial | <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama 1908 |
| Nombre común    | Psílido asiático de los cítricos      |

#### 4.1.2 Ciclo de vida

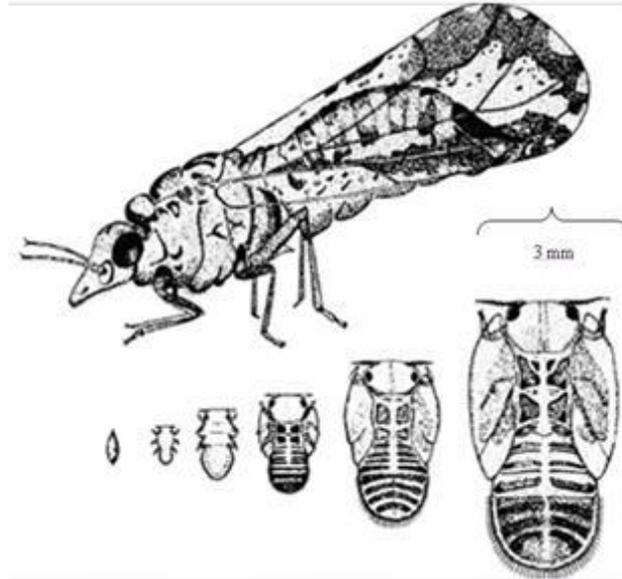
*D. citri* como todos los hemípteros tienen desarrollo paurometábola o gradual, por lo que presentan las fases de huevo, ninfas y adulto (Figura 1).

Los huevos son depositados en las puntas de los brotes tiernos y entre las hojas. Las hembras pueden ovipositar más de 800 huevos durante su vida. El ciclo total, requiere de 15 a 47 días, dependiendo de la estación. Puede haber de 9 a 10 generaciones en un año (Halbert and Manjunath, 2004). Viven entre uno y dos meses en dependencia de la temperatura y la planta hospedante en la que se alimenten (Liu and Tsai, 2000). Se señala una longevidad promedio para la hembra de 39.6 a 47.5 días a una temperatura de 25°C, con la característica particular de que pueden vivir por varios meses esperando hasta que llegue el periodo de brotación de las plantas hospedantes. Los apareamientos se realizan después de uno a tres días de la emergencia bajo condiciones favorables y se caracterizan por la presencia de brotes en las plantas. La oviposición comienza un día después del apareamiento (Étienne *et al.*, 2001). Los adultos se pueden encontrar en condiciones naturales durante todo el año, depositando huevos dondequiera que haya brotes disponibles (Huang *et al.*, 1984). A causa de la corta duración del ciclo del desarrollo, pueden observarse rápidamente numerosas ninfas que dan lugar a los adultos, los cuales se presentan en una menor cantidad, en virtud de que se mueven hacia otros brotes para depositar sus huevos luego de la cópula y continuar la infestación.

Otro elemento a resaltar es que existe buena sincronización entre el desarrollo del brote y el ciclo de vida de estos insectos, por lo que los brotes en crecimiento constituyen un factor fundamental en el comportamiento de la especie (Fernández y Miranda, 2005).

También se ha afirmado que no tolera humedades cercanas al punto de saturación debido a que esto favorece las epizootias fúngicas a las cuales las ninfas son muy susceptibles; sin embargo se han encontrado pocas muestras de individuos infectados por hongos en esta región, a pesar de existir condiciones de alta humedad relativa (Halbert and Manjunath, 2004).

En periodos secos los adultos son numerosos, mientras que las ninfas usualmente están ausentes (OEPP/EPPO, 2005).



**Figura 1.** Etapas de desarrollo de *Diaphorina citri* (Tomado: Cattling, 1970).

#### 4.1.3 Plantas hospedantes

Se desarrollan exclusivamente sobre plantas de la familia Rutaceae, con preferencia por los cítricos y *Murraya* spp. (OEPP/EPPO, 2005). Existen numerosas observaciones acerca de los hospedantes preferenciales de *D. citri*, Tsai and Liu (2000) realizaron un estudio comparativo a nivel de laboratorio, donde probaron las especies *Murraya paniculata* L., *Citrus jambhiri* Luch, *Citrus aurantium* L. (limón rugoso) y *Citrus paradisi* MacFadyen (toronja). *C. paradisi* resultó ser el mejor hospedante, mientras que entre las otras especies no se encontraron diferencias significativas.

#### 4.1.4 Huevo

Miden aproximadamente 0.31 mm de longitud y 0.15 mm de ancho. Presentan un extremo redondeado y el otro puntiagudo lo cual le da la apariencia de diminutas peras o almendras. Recién ovipositados son de color crema claro y con el desarrollo del embrión se tornan más amarillentos. Se insertan entre las hojas y los tallos individualmente, uno seguido del otro con el extremo romo sobre la base (apéndice A).

La fase fenológica preferida para la oviposición es la brotación vegetativa verde cuando está en punta de lanza (Fernández y Miranda, 2005; OEPP/EPPO, 2005). El número de huevos ovipositados puede depender de la planta hospedera. Por ejemplo, una media de 857 huevos por hembra fue depositado en plantas de toronja (*Citrus paradisi* Macfadyen), mientras que una media de 572 huevos fue depositada en limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lush). A 25 °C los huevos eclosionan en 4 días (Tsai and Liu 2000).

#### 4.1.5 Ninfas

*D. citri* presenta cinco estadios ninfales, las cuales varían su morfología de acuerdo a la edad (Tabla I) (OEPP/EPPO, 2005). Las ninfas recién eclosionadas tienen una coloración amarillo cremoso. Las ninfas del primer estadio, presentan un color amarillo claro. Sus tres pares de patas se caracterizan por el grosor que presentan y en el extremo terminal se observan dos setas conspicuas, rodeando la garra en que termina el tarso.

En el transcurso de los días aumentan de tamaño. Se mueven lentamente sobre el substrato dejando como huella la cera que expulsan por la estructura anal (apéndice A). No presentan esbozos alares y la coloración es más intensa. Las antenas son gruesas y presentan una larga y gruesa

seta en el extremo distal. Ventralmente se distingue el aparato bucal caracterizado por tener un largo estilete succionador de savia.

**Tabla I.** Estadios ninfales de *Diaphorina citri*

| Estadio | Longitud del cuerpo (mm) | Longitud de la antena (mm) | Color              |
|---------|--------------------------|----------------------------|--------------------|
| 1       | 0.33-0.35                | 0.06                       | amarillo claro     |
| 2       | 0.49–0.53                | 0.08                       | amarillo           |
| 3       | 0.69–0.72                | 0.14                       | amarillo           |
| 4       | 0.98–1.05                | 0.19                       | marrón amarillento |
| 5       | 1.45–1.58                | 0.27–0.30                  | marrón amarillento |

El extremo terminal del abdomen está bordeado de conspicuas setas en número de 10, las cuales están relacionadas con la cera que abundantemente secretan durante su desarrollo. La cera es producida por la pared del cuerpo, la cual está formada por una capa de células muy modificada. Estas estructuras dermales, variables en tamaño, son huecas y con el extremo apical abierto. En posición ventral se destaca la abertura anal de gran tamaño y en forma de media luna. Las ninfas mayores (segundo, tercer, cuarto y quinto estadio) presentan los esbozos alares, que aumentan su tamaño en dependencia de la edad (Fernández y Miranda, 2005).

#### **4.1.6 Adulto**

Miden generalmente de 3 a 4 mm de largo, cuerpo marrón moteado, la cabeza de color marrón claro y ligeramente más estrecha que el tórax. El aparato genital permite la distinción entre los sexos. El dimorfismo sexual, a pesar de no ser muy acentuado, permite distinguir al macho de la hembra por presentar más rojizos los ojos y el abdomen más puntiagudo y pequeño.

El primer par de alas; las alas anteriores, son más amplias hacia la mitad apical, moteadas y con una banda marrón que se extiende alrededor de la periferia de la mitad externa del ala, la banda está ligeramente interrumpida cerca del ápice. El patrón de la venación es la típica de los psílidos; el segundo par es membranosa transparente. Las antenas poseen una longitud de 0.48 mm, punta de color negro y dos pequeñas manchas de color marrón claro en los segmentos medios (apéndice A).

Generalmente el abdomen es negro en su parte dorsal y blanco-verdoso en la parte ventral (OEPP/EPPO, 2005), sin embargo el abdomen de una hembra adulta puede tornarse de un color amarillo-naranja brillante cuando esta grávida. La longitud del cuerpo del macho es de 1.53 - 1.66 mm y para la hembra de 1.90 - 2.06 mm.

Los adultos viven de 1 a 2 meses y la duración de su ciclo de vida puede verse influenciado por la temperatura y la planta hospedera (Tsai and Liu, 2000). Son activos saltadores y cuando se les perturba saltan cortas distancias, generalmente se alimentan en el envés de las hojas y cuando está en reposo flexiona el primer par de patas, por lo que, con relación a la superficie de la hoja, el cuerpo forma un ángulo agudo de aproximadamente 45 ° característico cuando se está alimentando (Fernández y Miranda, 2005).

#### **4.1.7 Distribución**

*D. citri* ha sido reconocida como una de las principales plagas que afectan a los cítricos en Asia subtropical y tropical, inicialmente en la India y en otros lugares de la región (Husain and Nath 1927; Pruthi and Mani, 1945). La evidencia disponible sugiere que es originario del subcontinente Indio (Hollis, 1987) y se ha extendido de esta región a otras productoras de cítricos en Asia

incluyendo países como Arabia Saudita, Afganistán, Bangladés, Lao, Myanmar, Camboya, China, Filipinas, Hong Kong, Indonesia, Irán, Japón, Malasia, Pakistán, Singapur, Sri Lanka, Taiwán, Tailandia, Vietnam, Yemen. En África en Islas Réunion y República de Mauricio.

Respecto al continente americano se detectó en países como Argentina, Bolivia, Colombia, Paraguay, Brasil (da Graca 1991), Venezuela (Cermeli *et al.*, 2000; Halbert and Núñez, 2004), Bahamas, Belice, Costa Rica, Cuba, El Salvador, Islas Guadalupe (Étienne *et al.*, 1998), Guatemala, Hawaii, Honduras, Islas Caimán, Jamaica, México, Puerto Rico, República Dominicana, Uruguay, Estados Unidos, específicamente en los estados de Texas (French *et al.*, 2001), Louisiana y Florida (Halbert *et al.*, 2002).

En México, la presencia del psílido asiático de los cítricos data del año 2002 en los estados de Campeche y Quintana Roo (Thomas, 2002); Coronado y Ruiz lo reportan en 2004, posteriormente, en un período de seis años fue registrado en el resto de las áreas cítricas del país (López-Arroyo *et al.*, 2009) (apéndice B).

#### **4.1.8. Daños**

Los daños causados por este insecto se pueden clasificar en directos, al alimentarse de la planta e indirectos cuando transmiten la bacteria causante la enfermedad denominada Huanglongbing (Chien and Chu, 1996).

##### **4.1.8.1 Daño directo**

El psílido asiático de los cítricos afecta a la mayoría de las especies de la familia Rutaceae incluyendo plantas ornamentales. El daño directo a la planta

ocurre como resultado de una alta población de psílicos (Halbert and Manjunath 2004). Los psílicos extraen grandes cantidades de savia de las plantas como forma de alimentación y producen grandes cantidades de túbulos cerosos. Estos túbulos cubren las hojas de los árboles fomentando el crecimiento de la fumagina que es una patología de las plantas producida por el desarrollo de un hongo saprófito (*Capnodium*, *Cladosporium*, entre otros) en la superficie de las hojas (apéndice C). Estos hongos al ser saprófitos se alimentan de las secreciones azucaradas que producen los insectos. La fumagina repercute en la calidad y cantidad de la producción de los productos agrícolas. Los consumidores rechazan productos manchados con fumagina. La cobertura que hace la fumagina impide la fotosíntesis y la acción de los estomas, también facilita la transmisión de virus y otros patógenos.

Además al alimentarse, el psílido, inyecta una toxina salivar que detiene la elongación terminal y causa malformación de hojas y brotes (Michaud, 2004). Una sola ninfa del psílido alimentándose en una hoja de cítrico por menos de 24 horas es capaz de causarle malformaciones.

A menudo, en infestaciones iniciales los psílicos se agregan en altas cantidades en árboles individuales dentro de huertos de cítricos. La agregación y la alimentación causan una distorsión en los brotes tiernos lo que permite que los psílicos ovipositen los sitios en mejores condiciones.

La brotación resulta severamente dañada y puede ocasionar la abscisión de hojas y brotes tiernos o malformación de hojas maduras. Los árboles maduros pueden soportar este daño por la pérdida de hojas o brotes en una pequeña porción de la copa del árbol, no así árboles de vivero o nuevas plantaciones (apéndice C) (Halbert and Manjunath, 2004).

#### **4.1.8.2 Daño indirecto**

El daño más serio causado por *D. citri* es debido a su particularidad de ser un eficiente vector de *Candidatus Liberibacter asiaticus* causante de la enfermedad del enverdecimiento de los cítricos conocida como Huanglongbing (HLB) vocablo chino que significa enfermedad del dragón amarillo (Halbert and Manjunath, 2004).

#### **4.2 Huanglongbing (HLB)**

El Huanglongbing (HLB) es una enfermedad destructiva que afecta a los cítricos. En este caso, la abreviatura HLB se utilizará como el nombre genérico de la enfermedad, independientemente del país donde se produzca. Los dos insectos vectores de esta enfermedad son: para África, el psílido *Trioza erytreae* y para Asia, *D. citri* (Halbert and Manjunath, 2004).

##### **4.2.1 Agente causal**

*Candidatus Liberibacter asiaticus* es una bacteria Gram negativa persistente no propagativa (se reproduce dentro del insecto pero no se transmite a otras generaciones). Se multiplica en la hemolinfa y dentro de las células de las glándulas salivales de los psílicos (apéndice D). El vector pica la planta y transmite la enfermedad. La bacteria circula por el floema y al tapar los vasos floemáticos impide la circulación de los nutrientes. El periodo de incubación de la enfermedad es de aproximadamente seis meses (Halbert and Manjunath, 2004).

#### **4.2.2 Modo de infección**

La principal vía de transmisión de la bacteria en el campo es mediante el insecto vector. Diversos trabajos han demostrado que un tiempo de alimentación de 5-7 horas es suficiente para adquirir y transmitir el patógeno. Los adultos y el cuarto y quinto instar son capaces de transmitir el patógeno por vía de secreción salivar después de un periodo de latencia que varía desde 1-25 días. Otra de las vías por las cuales se transmite el patógeno es mediante los injertos, con una eficiencia variable en dependencia de la parte de la planta que se emplee, la cantidad de tejido y el aislamiento del patógeno en cuestión.

Sobre la transmisión por semillas se posee poca información, la mayoría de los frutos caen prematuramente al suelo y en aquellos que permanecen en la planta, tienen una alta proporción de semillas abortadas. En las posturas procedentes de semillas de plantas enfermas se pueden observar síntomas típicos de la enfermedad (Halbert and Manjunath, 2004).

#### **4.2.3 Síntomas**

En los estados avanzados de la enfermedad pueden observarse hojas de color amarillo pálido con áreas de color verde irregulares (moteado) asimétricas, defoliación, engrosamiento y aclaración de las nervaduras, asimetría y difusión de colores en las nervaduras y folíolos, hojas pequeñas, intensa defoliación de las ramas afectadas y caída de los frutos; los síntomas comienzan a aparecer en otras ramas de la planta, llegando a tomar toda la copa; inclusive las puntas pueden llegar a secarse y morir; se afecta el desarrollo del sistema radicular; en el floema se observan lesiones necróticas, acumulación de almidón y efecto sinérgico con otras enfermedades.

También se puede observar caída prematura de los frutos, deformación y asimetría de los mismos, reducción del tamaño, coloración irregular. La deformación de los frutos aparece donde hay síntomas en las hojas.

Internamente puede observarse diferencia de maduración y aborto de semillas, desviación del eje y amarillamiento de las venas. Los frutos presentan elevada acidez, baja proporción de jugo y bajo contenido de azúcar, por lo que resultan no aptos para el consumo. En las plantas adultas los síntomas se localizan en las partes jóvenes, las plantas infestadas pueden manifestar defoliación severa, seguida de brotación irregular y floración fuera de época y en caso de infecciones muy severas, ocurre la muerte progresiva de la planta (Alemán *et al.*, 2007).

#### **4.2.4 Distribución**

El HLB ha afectado gravemente la producción de cítricos en diferentes países de Asia, África, Sub continente Indio y en la Península Arábiga. El HLB se ha detectado en Arabia Saudita; Bangladesh, Bhután, Birmania (Myanmar), Camboya, China, Filipinas, India, Indonesia, Japón, Malasia, Nepal, Papua Nueva Guinea, Paquistán, Tailandia, Taiwán, Timor Oriental, Vietnam, Yemen, Laos, Burundi, Camerún, Etiopía, Isla Mauricio, Kenya, Madagascar, Malawi, Nigeria, República Centroafricana, Réunion, Rwanda, Somalia, Sudáfrica, Swaziland, Tanzania, Zimbabwe (Halbert and Manjunath, 2004).

En el continente americano fue descubierta en Brasil en 2004, Estados Unidos en 2005, Cuba en 2007, República Dominicana en 2008 y recientemente detectada en Belice y México en el año 2009 (apéndice E).

En Julio de 2009 se encontraron los primeros psílicos y árboles con la bacteria causante del HLB en Tizimín, Yucatán; sin embargo, para septiembre de 2011 los informes de presencia de la enfermedad registran a los estados de Baja California Sur, Campeche, Colima, Chiapas, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Michoacán, Quintana Roo y Sinaloa (SENASICA, 2011) (apéndice B).

### **4.3 Métodos de Control**

#### **4.3.2 Control Químico**

Insecticidas como el Imidacloprid y abamectina han sido aplicados para suprimir poblaciones del psílido pero requieren múltiples aplicaciones (arriba de 6-8), generalmente son costosos, perturban el equilibrio de los enemigos naturales y pueden conducir al desarrollo de resistencia en el psílido (Srinivasan *et al.*, 2008). Las condiciones ambientales, principalmente la temperatura, afectan significativamente la toxicidad de los insecticidas y su eficacia (Scott, 1995). Además otros factores como la especie del insecto, el intervalo de temperatura probado, el modo de acción del insecticida, el método de aplicación, y la cantidad de insecticida que es ingerida o está en contacto con el insecto, se conoce que pueden tener influencia en la relación temperatura-toxicidad, la cual puede ser positiva, negativa o mixta (Sparks *et al.*, 1982; Toth and Sparks, 1990).

En México, López-Arroyo *et al.* (2010) con el objetivo de contribuir en el desarrollo de un plan regional para el manejo de *D. citri* y el Huanglongbing en el país, han evaluado más de 40 diferentes productos insecticidas en experimentos desarrollados en diversas áreas agroecológicas donde se encuentra establecida la citricultura nacional.

Los productos evaluados incluyeron organofosforados, piretroides, neonicotinoides, aceites minerales, botánicos, jabones, etc. De estos estudios se seleccionaron los productos que causaron mortalidad mayor a 85%. Con el propósito de evitar el posible desarrollo de resistencia en *D. citri* hacia los insecticidas, se ha sugerido un plan para el uso de estos basado en la rotación de los grupos toxicológicos de los productos.

El plan elaborado incluye las dosis de aplicación de los productos, el momento para efectuarlas en cítricos dulces y agrios, así como en árboles adultos y jóvenes. El programa promueve el uso de insecticidas registrados así como de productos alternativos que ejercen control de la plaga a un costo económico bajo. Durante el año 2011, el programa fue evaluado en diferentes áreas de la citricultura nacional (apéndice F).

#### **4.3.3 Control biológico**

*Diaphorina citri* Kuwayama está sujeta a varios niveles de control biológico en toda su distribución geográfica, principalmente por varios tipos de depredadores, parasitoides y en los últimos años, algunos hongos entomopatógenos (Hall, 2008).

##### **4.3.3.1 Depredadores**

*D. citri* es atacada comúnmente por depredadores generalistas como escarabajos (Coleoptera: Coccinellidae), como *Harmonia axyridis* Pallas, *Olla v-nigrum* Mulsant, *Cycloneda sanguinea* L. y *Curinus coeruleus* Mulsant (Michaud 2001, 2002, 2004; Michaud and Olsen, 2004) atacando a *D. citri*.

Sírfidos (Diptera: Syrphidae) del género *Allograpta* se han encontrado atacando a *D. citri* en Réunion, Nepal (Aubert, 1987) y *Allograpta obliqua* Say en Florida (Michaud, 2002); crisopas (Neuroptera: Chrysopidae, Hemerobiidae) como *Ceraeochrysa spp.* y *Chrysoperla rufilabris* Burmeister Okamoto y *C. septempunctata* Wesmael (Michaud 2004; Yang *et al.*, 2006) y arañas (Araneae) como *Hibana velox* (Becker) (Michaud, 2004).

*Zelus longipes* L. (Hemiptera: Reduviidae) es un depredador ocasional de *D. citri* en Florida (Hall *et al.*, 2008). *Z. renardii* (Hemiptera: Reduviidae) fue reportado depredando adultos de *D. citri* bajo condiciones de campo en Colima (Sánchez- González y Arredondo-Bernal, 2009).

Jasso-Argumedo *et al.* (2010) reportan a *Cycloneda sanguínea*, *Chrysoperla spp.*, *Ceraeochrysa* y *Olla v-nigrum* como depredadores de *D. citri* en huertas de limón persa en Yucatán, México.

Cortez-Mondaca *et al.* (2011) reportaron la presencia de cinco especies de Chrysopidae asociados a *D. citri* en huertas de cítricos de naranja y limón mexicano en Sinaloa, México: *Chrysoperla comanche*, *Chrysoperla rufilabris*, *Chrysoperla carnea*, *Ceraeochrysa valida* y *Ceraeochrysa claveri*.

Sobresaliendo *C. comanche* y *C. valida* en abundancia. *C. comanche* y *C. rufilabris* mostraron mayor consumo de las presas en diferentes tiempos de exposición, pero en la última lectura, a las 24 h de exposición, la capacidad de depredación fue prácticamente similar para todas las especies, alrededor de 100 especímenes por depredador (apéndice G).

#### 4.3.3.2 Parasitoides

*Tamarixia radiata* (Hymenoptera:Eulophidae) y *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae) son las dos especies principales de parasitoides que atacan a *D. citri*.

Las hembras de *T. radiata* atacan el tercer, cuarto o quinto estadio ninfal de *D. citri* (McFarland and Hoy, 2001; Skelley and Hoy, 2004). Las hembras depositan uno o dos huevos por debajo de la ninfa, la larva se desarrolla y alimenta externamente en el lado ventral de las ninfas, transformando al hospedero en una especie de momia sellada al tejido de la planta.

La pupación ocurre dentro de la momia y los nuevos adultos emergen dejando un hoyo en la región torácica y de la cabeza de la momia. Aunque las hembras depositan más de un huevo, usualmente solo una de las larvas alcanza el estado adulto, por lo tanto *T. radiata* es considerado como un parasitoide solitario. Además de matar a las ninfas a través de parasitismo, las hembras adultas se alimentan de ninfas jóvenes (Chien, 1995; Skelley and Hoy, 2004) (apéndice H).

Sánchez-González *et al.* (2011) reportan que en Colima, México *T. radiata* es producido dentro de un programa gubernamental para la cría masiva, liberación y evaluación en campo como alternativa para el control de *D. citri*. Mencionan que durante el tiempo de liberación y monitoreo de la fluctuación poblacional de ninfas de *D. citri*, se observa una tendencia en la reducción del nivel poblacional de ninfas del tercer al quinto instar en la huerta bajo tratamiento en comparación con la huerta donde no se realizaron liberaciones. Reportando, reducciones de hasta el 92.6 % en la huerta bajo liberaciones de *T. radiata*.

En contraste, en la huerta sin liberaciones se ha observado una tendencia a la estabilidad del nivel poblacional de ninfas de *D. citri* al igual que al número de ninfas parasitadas presentes.

*Diaphorencyrtus aligarhensis* es un endoparasitoide nativo de la India y registrado en Filipinas, Vietnam y China (Aubert, 1987), (Yang *et al.*, 2006). Las hembras de *D. aligarhensis* parasitan del segundo al cuarto estadio ninfal de *D. citri* además de alimentarse de ellas. Las ninfas del cuarto instar se convierten en momias en 10 días y los parasitoides adultos emergen de siete a ocho días después por un hoyo de salida en la región abdominal de la ninfa momificada (Skelley and Hoy, 2004) (apéndice H).

#### 4.3.3.3 Hongos entomopatógenos

Un importante número de especies de hongos entomopatógenos han sido reportadas infectando a *D. citri* alrededor de mundo entre las que se incluyen a: *Isaria fumosorosea* Wize (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (Samson, 1974; Subandiyah *et al.*, 2000); *Hirsutella citriformis* Speare (Rivero-Aragón and Grillo-Ravelo, 2000; Subandiyah *et al.*, 2000; Étienne *et al.*, 2001); *Cephalosporium lecanii* Zimm (*Verticillium lecanii*) (Rivero-Aragón and Grillo-Ravelo, 2000; Xie *et al.*, 1988); *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Rivero-Aragón and Grillo-Ravelo, 2000; Yang *et al.*, 2006); *Cladosporium* sp. nr. *oxysporum* Berk. & M.A. Curtis y *Capnodium citri* Berk. and Desm. (Aubert 1987); *Paecilomyces javanicus* (Friederichs & Bally) AHS Brown & G. Smith, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas, *Acrostalagmus aphidum* Oudem (Yang *et al.*, 2006).

*C. sp. nr. oxysporum* y *C. citri* han sido considerados un factor importante de mortalidad de *D. citri* en Islas Réunion; mortalidades de 60-70 % ocurrieron cuando la humedad excedió cerca del 88% (Aubert,1987). Por otra parte *H. citrifomis* ha sido reportado en Guadalupe en periodos en los que la humedad fue superior al 80 % (Étienne *et al.*, 2001).

En Florida, cadáveres de adultos de *D. citri* fueron reportados infectados por *H. citrifomis* e *I. fumosorosea* (Meyer *et al.*, 2007; 2008). Reyes-Rosas *et al* (2010) reportan la presencia en Tamaulipas, México de una infección causada por un hongo entomopatógeno sobre poblaciones del psílido, el hongo se identificó como *Hirsutella citrifomis*. El inicio de la epizootia ocurrió entre los meses de julio y agosto, teniendo los picos máximos de infección entre septiembre y noviembre, período en el cual, las temperaturas (media entre 25 y 28°C) y la humedad relativa promedio (alrededor del 80%) le son favorables para generar infecciones. No se detectaron ninfas atacadas por el hongo.

Hall *et al* (2012) condujeron un estudio a nivel de campo durante dos años en un huerto de naranjos (*Citrus reticulata* Blanco, *C. sinensis* (L.) Osbeck y *C. reshni* Hort) para caracterizar la fenología de *H. citrifomis* Speare infectando adultos de *D. citri*. En promedio se registró una mortalidad de 23 % de insectos adultos observados en hojas maduras. Los psílicos muertos se caracterizaron por estar momificados y cubiertos con varios sinemas producidos por el hongo (apéndice I).

#### **4.4 Generalidades de los hongos entomopatógenos**

Los hongos entomopatógenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plagas. Virtualmente todos los insectos son susceptibles a las enfermedades causadas por hongos.

Se conocen diversas especies de hongos entomopatógenos, correspondientes a alrededor de 100 géneros. Entre los géneros más importantes podemos mencionar: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (Monzón, 2001).

#### **4.4.1 *Beauveria bassiana***

La historia temprana de *B. bassiana* se inició en 1835. Agostino Bassi di Lodi en Italia, fue el primero en demostrar que un hongo puede causar enfermedades en los insectos, lo cual lo llevó a enunciar la teoría de los gérmenes de la enfermedad. Él observó una enfermedad del gusano de seda, *Bombyx mori*, a la que denominó “muscardina blanca” y comenzó con los primeros experimentos de infección. El hongo fue estudiado y descrito por el naturalista italiano Giuseppe Gabriel Balsamo-Crivelli en 1835, quien le dio el nombre *Botrytis bassiana*, en honor a Bassi. En 1911 Beauverie estudió el hongo de nuevo y en 1912 Vuillemin creó el nuevo género en honor a Beauverie, de los cuales la especie *Beauveria bassiana* se convirtió en la especie tipo. Actualmente *Beauveria bassiana* es la especie más ampliamente distribuida del género, y es considerado un hongo entomopatógeno ubicuo que ha sido aislado de una amplia variedad de insectos de todos los órdenes (Zimmermann, 2007a).

#### 4.4.1.1 Ubicación taxonómica

|                 |  |
|-----------------|--|
| Super reino     | Eukaryota                              |
| Reino           | Fungi                                  |
| Sub-reino       | Dikarya                                |
| Filum           | Ascomycota                             |
| Sub-filum       | Pezizomycotina                         |
| Clase           | Sordariomycetes                        |
| Sub-clase       | Hypocreomycetidae                      |
| Orden           | Hypocreales                            |
| Familia         | Cordycipitaceae                        |
| Género          | <i>Cordyceps</i> (= <i>Beauveria</i> ) |
| Especie         | <i>bassiana</i>                        |
| Nombre binomial | <i>Beauveria bassiana</i>              |
| Nombre común    | Hongo de la muscardina blanca          |

#### 4.4.1.2 Rango de hospederos

Li (1988) enlistó 707 especies de insectos hospederos de *B. bassiana*, esto comprende 521 géneros y 149 familias en 15 ordenes. Además de 13 especies de Acarina distribuidos en siete géneros y seis familias. Los órdenes de insectos en las cuales *B. bassiana* ha sido catalogado como patógeno son: Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Diptera, Hemiptera, Ortoptera, Siphonaptera, Isoptera, Thysanoptera, Mantodea, Neuroptera, Dermaptera, Blattodea y Embioptera.

Sin embargo, a pesar de la prevalencia de *B. bassiana* en un gran número de artrópodos, se sabe que la mayoría de los aislados de este hongo tienen una gama de hospederos limitada (Vestergaard *et al.*, 2003). Existen varios ejemplos en que aislados de *B. bassiana* a partir de un insecto

huésped distinto o desde el suelo son altamente virulentas contra otras plagas blanco (Cottrell and Shapiro-Ilan, 2003). Por lo tanto, es necesario evaluar la virulencia de diferentes aislados contra una especie de insectos blanco con la finalidad de seleccionar el más virulento.

#### **4.4.1.3 Morfología**

*B. bassiana* se caracteriza por presentar un micelio blanco, las colonias presentan un aspecto aterciopelado a polvoriento; blancas en los bordes que se vuelven amarillo-pálidas, algunas veces rojizas, incoloras al reverso, amarillas o rojizas. Conidióforos abundantes, que se levantan a partir de las hifas vegetativas sosteniendo grupos de células conidiógenas que se pueden ramificar para originar más células globosas o en forma de botella en la parte basal con un raquis de hasta 20 µm de largo, en su mayoría formando un zig-zag.

Los conidios son hialinos, lisos, globosos a ligeramente elipsoidales (2-3 x 2.0-2.5 µm), generalmente forman racimos parecidos a bolas de nieve o de algodón (Zimmermann, 2007a) (apéndice J).

#### **4.4.2 *Isaria fumosorosea***

La primer descripción de *I. fumosorosea* fue realizada por Wize en 1904 cuando lo aisló de una larva del picudo de la remolacha *Cleonus punctiventris* en Ucrania. Posteriormente basándose en el estudio monográfico del género *Paecilomyces* realizado por Samson (1974), *I. fumosorosea* Wize se incluyó en la sección recién creada denominada *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* y desde entonces se le denominó *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith por muchos años (Zimmermann, 2008).

A través de los años, varias investigaciones filogenéticas demostraron que el género *Paecilomyces* es polifilético (Obornik *et al.*, 2001; Luangsa-ard *et al.*, 2005; Inglis and Tigano, 2006). Luangsa-ard *et al* (2005) estudiaron las relaciones filogenéticas de las especies pertenecientes a la sección *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* utilizando el gen de la  $\beta$ -tubulina y el espaciador interno transcrito (ITS) rDNA.

Ellos encontraron que la sección es polifilético dentro de los Hypocreales (Ascomycota), y un grupo monofilético fue reconocido y designado como el clado *Isaria*, que incluye *I. farinosa* e *I. fumosorosea*. Estos resultados fueron apoyados por Inglis y Tigano (2006) al analizar el rDNA 5.8 S y las secuencias ITS1 e ITS2.

#### 4.4.2.1 Ubicación taxonómica

|                 |  |
|-----------------|--|
| Super reino     | Eukaryota                              |
| Reino           | Fungi                                  |
| Sub-reino       | Dikarya                                |
| Filum           | Ascomycota                             |
| Sub-filum       | Pezizomycotina                         |
| Clase           | Sordariomycetes                        |
| Sub-clase       | Hypocreomycetidae                      |
| Orden           | Hypocreales                            |
| Familia         | Cordycipitaceae                        |
| Genero          | <i>Isaria</i> (= <i>Paecilomyces</i> ) |
| Especie         | <i>fumosorosea</i>                     |
| Nombre binomial | <i>Isaria fumosorosea</i>              |

#### 4.4.2.2 Rango de hospederos

En lo que respecta a su distribución mundial *I. fumosorosea* tiene un rango relativamente amplio de hospederos predominantemente Lepidópteros, pero relativamente más estrecho en comparación con *B. bassiana* (Zimmermann, 2007a, 2008). De acuerdo al catálogo de la USDA-ARS correspondiente a la colección de cultivos de hongos entomopatógenos (ARSEF) (Humber and Hansen, 2005) las principales ordenes de insectos que afecta *I. fumosorosea* son: Acari, Blattodea, Coleoptera, Díptera, Hemiptera, Hymenoptera, Isóptera, Lepidoptera, Neuroptera y Thysanoptera.

#### 4.4.2.3 Morfología

*I. fumosorosea* es un hongo de rápido crecimiento. En ocasiones las colonias basalmente tienen aspecto de fieltro o pueden tener un aspecto polvoriento, granular. Producen coremios definidos que son polvorientos cuando el hongo es aislado por primera vez. Al principio las colonias son blancas, y pueden permanecer así o cambiar con el tiempo a tonalidades rosadas y grisáceas. Los conidióforos se producen solos o en grupos, de paredes lisas, hialinas, con verticilos ramificados con grupos de 3-6 fiálides. Algunas veces el patrón verticilado se rompe y sobre el conidióforo se producen ramas sencillas. Fiálides con una base ancha globosa a elipsoidal que se adelgaza a un cuello delgado y largo, como en forma de botella. Los conidios son cilíndricos a fusiformes (3-4 x 1-2  $\mu\text{m}$ ), con extremos redondeados, lisos, hialinos o ligeramente rosados, formando estructuras tipo cadenas (Zimmermann, 2008) (apéndice K).

### 4.4.3 *Metarhizium anisopliae*

*Metarhizium anisopliae*, anteriormente conocido como *Entomophthora anisopliae*, es un hongo ampliamente distribuido que habita en el suelo. El primer uso de *M. anisopliae* como un agente microbiano contra los insectos fue en 1879, cuando Elie Metchnikoff lo aisló del escarabajo del trigo, *Anisoplia austriaca* (Herbst) descrito por Sorokin. Más tarde fue usado para controlar el gorgojo de la remolacha azucarera, *Cleonus punctiventris* (Bischoff *et al.*, 2009).

#### 4.4.3.1 Ubicación taxonómica

|                 |                               |
|-----------------|-------------------------------|
| Super reino     | Eukaryota                     |
| Reino           | Fungi                         |
| Sub-reino       | Dikarya                       |
| Filum           | Ascomycota                    |
| Sub-filum       | Pezizomycotina                |
| Clase           | Sordariomycetes               |
| Sub-clase       | Hypocreomycetidae             |
| Orden           | Hypocreales                   |
| Familia         | Clavicipitaceae               |
| Genero          | <i>Metarhizium</i>            |
| Especie         | <i>anisopliae</i>             |
| Nombre binomial | <i>Metarhizium anisopliae</i> |
| Nombre común    | Hongo de la muscardina verde  |

#### **4.4.3.2 Rango de hospederos**

*M. anisopliae* frecuentemente puede ser aislado de suelos en los trópicos y en las regiones templadas; parasitan una amplia gama de especies de insectos y es un agente de alto potencial en el control biológico de plagas agrícolas. Se considera que ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diversos órdenes (Ferrón, 1981).

*M. anisopliae* se ha utilizado para el manejo y la prevención de infestaciones de varias especies de la superfamilia Acridoidea, incluyendo langostas y saltamontes (Milner and Pereire, 2000; Hunter *et al.*, 2001; Lomer *et al.*, 2001).

#### **4.4.3.3 Morfología**

Las colonias presentan un margen micelial blanco. Conidióforos con aspecto de "terrones" que se colorean con el desarrollo de las esporas. El color varía desde oliváceo hasta amarillo-verde o verde oscuro. Esporas formadas sobre hifas columnares, a veces discretos esporodoquios, como costras. Al reverso incoloras o color miel. Conidióforos abundantes, usualmente con 2-3 ramificaciones por nodo. Fiálides cilíndricas o clavadas que se adelgazan abruptamente hacia el ápice. Conidios en cadena formados en los ápices de las fiálides, estrechos, cilíndricos, delgados y truncados en ambos extremos, hialinos a oliváceos o verdes (Bischoff *et al.*, 2009) (apéndice L).

#### **4.5 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos**

El desarrollo de micosis puede estar dividido en tres fases: (1) adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto, (2)

penetración en el hemocele y (3) desarrollo del hongo. Lo cual generalmente resulta en la muerte del insecto (Alean-Carreño, 2003).

#### **4.5.1 Adhesión de la espora a la cutícula del hospedero**

El primer contacto que hace la espora con la superficie del hospedero es por la cutícula la cual está compuesta principalmente de proteínas, quitina, lípidos y compuestos fenólicos, los cuales funcionan como una barrera contra la invasión de microorganismos y medio ambiente (Hegedus y Khachatourians, 1995). Las características físicas y químicas de las superficies de la cutícula del insecto y la espora son las responsables de esta unión.

En algunos hongos la adhesión es un fenómeno inespecífico, mientras en otros esto es un proceso específico. Algunas glicoproteínas pueden servir como un receptor específico para las esporas (Tanada and Kaya, 1993). Se ha sugerido que iones divalentes como el  $\text{Ca}^{+2}$  y el  $\text{Mg}^{+2}$  reducen las fuerzas de repulsión electrostática de la superficie del insecto, por lo que pueden afectar su hidrofobicidad y promover la adhesión pared celular fúngica-cutícula, creando condiciones favorables para el establecimiento de la espora y la subsecuente invasión del hospedero (Barnes y Moore, 1997; Jeffs *et al.*, 1997; Wessels, 1999).

#### **4.5.2 Germinación de la espora**

Se entiende por germinación al proceso mediante el cual una espora emite uno o varios pequeños tubos germinales, los cuales por crecimiento y alargamiento dan origen a las hifas (Volcy y Pardo, 1994). La germinación de las esporas se inicia con el hinchamiento de la misma, que es favorecido por una humedad alta (70% durante 14h); la germinación es disparada por mensajeros que generalmente son carbohidratos presentes en las proteínas

cuticulares del insecto (Hegedus y Khachatourians, 1995; Khachatourians, 1996).

La hidratación de la espora es favorecida por la acción antidesecante de su cubierta mucilaginosa, que además funciona como protector ante la presencia de polifenoles tóxicos y enzimas, secretadas por sistema inmune del insecto. Este proceso depende en gran parte de la humedad ambiental y temperatura, y en menor grado de las condiciones de luz y nutricionales (Tanada and Kaya, 1993).

El nivel de agua es determinante en el crecimiento de los hongos y pequeñas diferencias en los niveles de humedad relativa después de la aplicación de conidios, pueden determinar de un modo u otro el éxito del hongo en el control de insectos plaga (Gillespie, 1988).

El resultado de la germinación y la penetración puede no depender necesariamente del porcentaje total de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, modo de germinación, agresividad del hongo, el tipo de espora y la susceptibilidad del hospedero (Samson *et al.*, 1988).

#### **4.5.3 Penetración del integumento**

La penetración de la cutícula del insecto por conidias germinadas, ocurre como resultado de una combinación entre la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica por el tubo germinal (Gillespie, 1988). El modo de penetración principalmente depende de las propiedades de la cutícula, grosor, esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales (Charnley, 1984).

La fuerza mecánica es notable en el extremo de una hifa invasiva donde la capa cuticular es deformada por presión (Tanada and Kaya, 1993).

Se produce un tubo germinativo y un apresorio, con éste se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto.

En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula.

El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan degradación del tejido en la zona de penetración, lo que facilita la penetración física (Monzón, 2001). Las enzimas descubiertas en el tubo germinativo son proteasas, aminopeptidasas, lipasas, esterases, y N-acetilglucosamidasa quitinasas).

Estudios *in vitro* indican que en la digestión del integumento sigue una secuencia de lipasa-proteasa-quitinasa (Tanada and Kaya, 1993). Una vez dentro del insecto, el hongo prolifera formando cuerpos hifales secundarios, que se ramifican en la procutícula conformada principalmente de fibrillas lameladas de quitina embebidas en una matriz proteínica que actúa como cubierta física protectora ante las secreciones extracelulares del patógeno. Posteriormente, los cuerpos hifales se encuentran con la capa epidérmica y con su respectiva membrana basal y se diseminan a través del hemocele (Deshpande, 1999). Así, invaden diversas estructuras como tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias, hemocitos, retículo endoplásmico y membrana nuclear.

Cabe destacar que durante la penetración del hongo desde la cutícula del insecto hasta el hemocele, la hifa queda inmersa en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos; algunos de ellos son nutrimentos pero otros pueden inhibir su crecimiento, ya que el insecto

activa su sistema inmune a través de procesos como la melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento (St. Leger y Roberts, 1997).

Sin embargo, los hongos desarrollan una serie de actividades que les permiten evitar este tipo de defensas, tales como cambios en la pared celular y producción de sustancias inmunomoduladoras o toxinas fúngicas (Khachatourians, 1991).

#### **4.5.4 Penetración a través de cuerpos abiertos**

Los hongos pueden infectar insectos a través de la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas de un insecto. Puesto que la humedad no es un problema en el tracto alimenticio, la espora puede germinar rápido en este ambiente; por otra parte, los fluidos digestivos pueden destruir la espora o la hifa germinativa. En algunos casos, la digestión de estructuras fúngicas puede causar la muerte por toxicidad más que por micosis (Charnley, 1984).

#### **4.5.5 Replicación en el hemocele**

Después de llegar al hemocele, la mayoría de los hongos convierten el crecimiento micelial en una fase de levadura o sea crecimiento por gemación. Se producen toxinas y enzimas, aunque algunos hongos aparentemente carecen de toxinas, matan el insecto al consumir todos los nutrientes o por destrucción física (Bustillo, 2001).

Las toxinas causan la muerte del insecto debido a la degeneración de los tejidos, producto de la pérdida de la integridad estructural de las membranas seguido de la deshidratación de las células por pérdida de fluido (Ferrón, 1981). Posterior al crecimiento del hongo en el hemocele, la micosis

induce a síntomas fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos alterados.

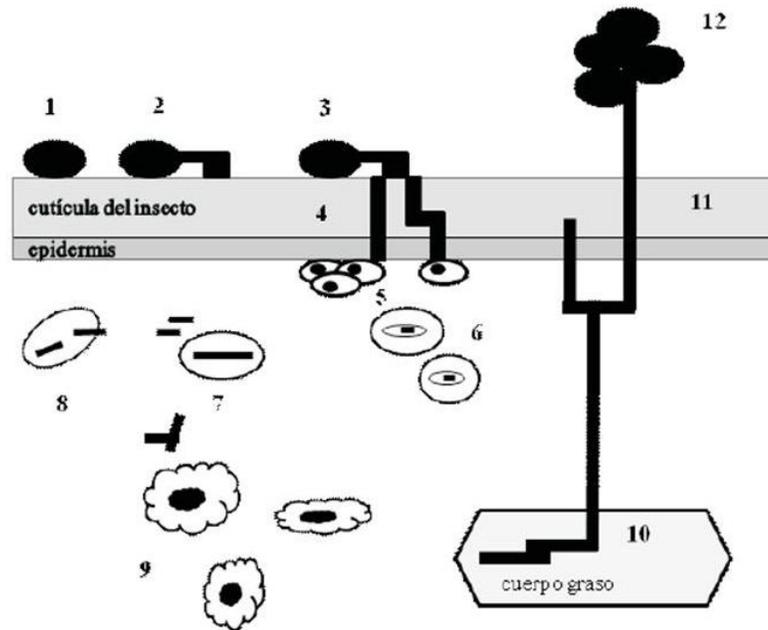
Ocurre una competencia entre el hongo y la flora intestinal. En la mayoría de los casos los hongos producen sustancias antibacteriales y cambio de color del cadáver (Ferrón, 1978).

Cuando el insecto muere y al agotarse los nutrientes, el hongo inicia un crecimiento micelial invadiendo todos los órganos del hospedero. Finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie, e inician la formación de esporas cuando la humedad relativa es adecuada (Gillespie y Claydon, 1989).

La esporulación sobre el cadáver produce inóculo para infectar a otros insectos. Si las condiciones no son favorables, queda dentro del cadáver del insecto, donde puede sobrevivir por algunos meses y eventualmente producirá esporas cuando lleguen las condiciones favorables. La esporulación ocurre generalmente en cadáveres pero puede también ocurrir en insectos vivos (Tanada and Kaya, 1993).

#### **4.5.6 Dispersión de las esporas**

La dispersión de la spora puede ser un proceso activo o pasivo y depende de las características de la spora y el esporangio. Cada conidia puede adherirse o pasar de un invertebrado a otro por dispersión (Tanada and Kaya, 1993). El mecanismo de acción de los entomopatógenos se resume en forma esquematizada en la figura 2.



**Figura 2.** Esquema del desarrollo de un hongo entomopatógeno. 1. Adhesión de la espora a la cutícula del insecto, 2. Germinación y formación del apresorio, 3. Penetración de la cutícula, 4. Crecimiento lateral y penetración en la epidermis, 5. Agregación de los hemocitos en el lugar de penetración fúngica, 6. Fagocitosis de cuerpos hifales por células fagocíticas del insecto, 7. Transformación a cuerpos levaduriformes, 8. Evasión del sistema inmune, 9. Propagación en el hemocelele, 10. Transformación a cuerpo hifal, 11. Esporulación y germinación atravesando la cutícula del insecto, 12. Diseminación de las esporas (Tomado de Téllez-Jurado *et al.*, 2009).

## 4.6 Enzimas

### 4.6.1 Función de las enzimas durante el proceso de infección

El éxito en la penetración de la cutícula de los insectos depende principalmente de varias enzimas hidrolíticas que degradan las proteínas, quitinas y lípidos en el integumento del insecto y proporcionan nutrientes para el hongo (Feng *et al.*, 1994; Hegedus y Khachatourians, 1995). Los niveles de enzimas específicas que degradan la cutícula como la lipasa, quitinasa, proteasa, quimoelastasa, y quimotripsina tienen relación con los parámetros de virulencia específica (Gupta *et al.*, 1994).

Indudablemente, muchas enzimas patogénicas son importantes al determinar la virulencia debido a que permiten al patógeno coexistir con el proceso de cambios metabólicos asociados al estado de la enfermedad del hospedero (Hajek y St. Leger, 1994). Sin embargo, las enzimas no son el único factor que influye en el fenómeno de la virulencia, o en el éxito del proceso de la infección (Champlin *et al.*, 1981). Otros factores pueden ser el éxito de la adhesión de la conidia a la cutícula, presencia de ácidos grasos en la superficie de la cutícula, crecimiento fúngico antes de la penetración, y la producción y regulación de otras toxinas (Bidochka y Khachatourians, 1990).

Las lipasas y proteasas actúan antes que las quitinasas, la producción secuencial de estas enzimas se puede interpretar con respecto a la estructura física de la cutícula del insecto, las fibras de quitina son rodeadas por una capa de proteína; por consiguiente, la quitina no puede ser degradada hasta que las proteínas son removidas (Bidochka *et al.*, 1997; Leathers y Gupta, 1993).

Estas enzimas son sintetizadas en una manera coordinada con relación a la estructura cuticular, y son inducidas *in vitro* cuando son cultivadas sobre cutícula de insecto; la significancia de alguna de las enzimas depende de las características cuticulares, y estado fisiológico del insecto, así como de los mecanismos de invasión por el hongo (Hegedus y Khachatourians, 1995).

#### **4.6.2 Lipasas**

Las lipasas son enzimas que hidrolizan triglicéridos a ácidos grasos y glicerol, y bajo ciertas condiciones catalizan la reacción inversa. Algunas de estas enzimas son también capaces de catalizar reacciones de transesterificación (Pokorny *et al.*, 1994).

Los lípidos de la epicutícula son la primer barrera en cruzar, por lo que las lipasas son importantes en el proceso de la infección; la composición de estos lípidos incluye aproximadamente 65% de alcanos, 25% de ésteres cerosos secundarios, triglicéridos, alcoholes, y ácidos grasos; además de lípidos, la cutícula contiene aminoácidos, y aminoazúcares que funcionan como nutrientes para la germinación del hongo (Bidochka *et al.*, 1997).

La incapacidad para utilizar los lípidos que predominan sobre la superficie de la cutícula puede reducir la virulencia de algunos hongos; estos lípidos son suficientemente heterogéneos y contribuyen en la especificidad de la relación patógeno-hospedero (St. Leger, 1993). La importancia de las lipasas depende principalmente del sistema de especificidad patógeno-hospedero (Hegedus y Khachatourians, 1995).

Los estudios preliminares indican que existen dos posibles funciones de los lípidos cuticulares de los insectos en la actividad de los hongos entomopatógenos; algunos de ellos podrían ser usados como recursos pobremente accesibles de energía para la germinación de la espora.

Otros podrían tener una actividad antifúngica específica probablemente expresada en el crecimiento hifal, polaridad, insaturación, o ramificación como longitud de cadenas de los lípidos cuticulares probablemente involucrados en cada proceso.

Es necesario realizar investigaciones sobre la posible correlación entre cepas infectivas y los lípidos cuticulares de los hospederos (Leucona *et al.*, 1997).

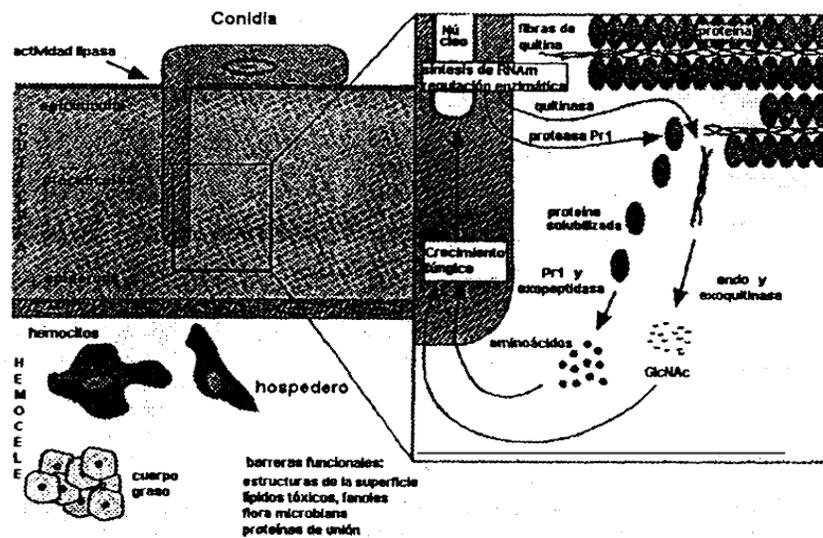
### 4.6.3 Proteasas y Quitinasas

Una vez que la superficie lípida de la epicutícula es degradada por las lipasas, el hongo produce grandes cantidades de proteasas (PrI), para degradar el material proteínico de la procutícula que se encuentra adherido como una cubierta de la quitina. Las enzimas proteolíticas (comúnmente llamadas proteasas) pertenecen al grupo de las hidrolasas (Guadix *et al.*, 2000), degradan las cadenas polipeptídicas de las proteínas-sustrato (Carrera, 2003), e hidrolizan enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad. Una vez liberadas las fibras de quitina, las proteínas solubilizadas son degradadas por aminopeptidasas y exopeptidasas, para ser convertidas en aminoácidos útiles como nutrientes para el hongo (Bidochka *et al.*, 1997).

La degradación de la cubierta de proteína permite acceder a las enzimas quitinolíticas hacia las fibras de quitina para degradarlas, lo cual induce a la producción de más quitina (GlcNAc), y esta a su vez a la síntesis de más quitinasa, reduciendo la actividad de las proteasas (Hegedus y Khachatourians, 1995; Bidochka *et al.*, 1997). Las quitinasas son enzimas que degradan la quitina, un polisacárido de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) con enlaces  $\beta$  (1, 4), sobre los cuales actúan, hidrolizándolos.

Las quitinasas extracelulares o N-acetilglucosamidasa (NAGasa) son producidas después que las proteasas; esta secuencia en la producción de las enzimas se debe a la estructura física de la cutícula del insecto. Las fibras de quitina se encuentran cubiertas por una capa de proteína, la cual debe ser degradada para poder activar a las quitinasas e hidrolizar la quitina (Bidochka *et al.*, 1997); sin embargo, la degradación parcial de lípidos es suficiente para abrirle el camino a las quitinasas (Samsináková *et al.*, 1971).

Las proteasas extracelulares solubilizan las proteínas cuticulares, las cuales ayudan en la penetración y proporcionan nutrientes para una mayor proliferación del hongo dentro del insecto (Bidochka *et al.*, 1997). Durante los primeros estados de infección, la proteasa Pr1 de *B. bassiana* se localiza próxima a la hifa, pero es indispensable la separación mecánica de las proteínas, en los últimos estados, Pr1 se distribuye en toda la región de invasión (Hegedus y Khachatourians, 1995) (Figura 3).



**Figura 3.** Representación de la interacción entre las enzimas extracelulares y la degradación de la cutícula de los insectos. (Tomado de España-Luna, 2000).

Se ha identificado una amplia variedad de enzimas catabólicas en hongos entomopatógenos; alcalino fosfatasa, esterasa C4, esterasa/lipasa C8, lipasa C14, leucina aminopeptidasa, valina aminopeptidasa, cisteína aminopeptidasa, tripsina, quimotripsina, ácido fosfatasa, fosfohidrolasa  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa,  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucosaminidasa,  $\alpha$ -mannosidasa y  $\alpha$ - fucosidasa, y  $\beta$ -

galactosidasa. Aun no se ha descifrado con claridad la contribución de estas enzimas en los procesos de infección (Hegedus y Khachatourians, 1995).

#### **4.7 Producción de hongos entomopatógenos**

La producción de hongos entomopatógenos se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas en un sustrato (Monzón, 2001).

El proceso de desarrollo de un agente de control microbiano con lleva varias etapas desde el aislamiento hasta su uso, las cuales deben tener una secuencia determinada. La etapa inicial comprende el aislamiento del microorganismo y la evaluación de su actividad biocontroladora, seguida de su caracterización y conservación (Cotes, 1997); además de definir un medio de cultivo y un sistema adecuado para la obtención masiva del inóculo que permita una buena relación costo-rendimiento en la producción (Fernández y Juncosa, 2002).

Un factor clave en la selección de nuevos aislados como potenciales agentes de control biológico, específicamente en hongos entomopatógenos, es la capacidad de la cepa para ser producida en grandes cantidades (altas tasas de esporulación), tener un rápido crecimiento y no perder su viabilidad e infectividad (Goettle and Roberts, 1992; Feng, *et al.*, 1994).

Sin embargo, una limitante para lograr estos objetivos suelen ser el medio y el método de cultivo ya que la elección de ambos parámetros depende en gran medida de las especies fúngicas a utilizar y el tipo de propágulo requerido para la formulación y el método de aplicación (Derakhshan *et al.*, 2008).

#### **4.7.1 Requerimientos nutricionales**

Existen dos requerimientos nutricionales principales en el desarrollo de la esporulación, que son la fuente de carbono y nitrógeno. La glucosa es la fuente de carbono más ampliamente utilizada por los hongos (Pérez y Ramírez, 2000), la fructosa y la manosa son las siguientes azúcares más utilizadas seguidas de la galactosa, sacarosa, lactosa, maltosa y polisacáridos como el almidón, celulosa, pectina (Griffin, 1981), quitina (Hegedus *et al.*, 1990), trehalosa, sorbitol y manitol (Bidochka *et al.*, 1990). Por su parte, el nitrógeno es requerido por los hongos para sintetizar aminoácidos, proteínas, y ácidos nucleicos necesarios para la construcción del protoplasma (Pérez y Ramírez, 2000). Los hongos en su gran mayoría prefieren fuentes de nitrógeno orgánico como urea e hidrolizado de caseína (Griffin, 1981), peptona, levadura (Hegedus *et al.*, 1990), líquido de remojo de maíz (Blachere *et al.*, 1973) y casaminoácidos (Jackson *et al.*, 1997). Sin embargo también se menciona el uso de fuentes inorgánicas de nitrógeno como  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Bidochka *et al.*, 1990).

#### **4.7.2 Medios de cultivo**

Todos los medios de cultivo utilizados en la propagación de hongos deben contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo de sus estructuras (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc). El pH debe ser preferentemente ácido para facilitar el crecimiento de los hongos e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos, incluso se utilizan algunos antibióticos para inhibir el crecimiento de las bacterias saprófitas que suelen contaminar las muestras (Alean-Carreño, 2003).

Existen tres tipos de medios de cultivo para los hongos de acuerdo a su procedencia y origen de sus componentes:

Medios naturales: se caracterizan por estar preparados por compuestos de origen natural y su composición no es exacta, como pedazos o infusiones de frutas, vegetales, granos de cereales o tejidos animales. Estos medios varían mucho en su composición, no son fácilmente reproducibles, ni de amplio uso.

Medios semi-sintéticos, están conformados por compuestos de origen natural y químico, estos medios de cultivo están preparados con peptonas, extractos de plantas, agar y otros compuestos de procedencia desconocida o variable.

Medios sintéticos, presentan composición química definida cuantitativa y conocida. La mayoría de las fórmulas de los medios de cultivo utilizados para hongos contienen peptona, algún carbohidrato y agar (Alean-Carreño, 2003).

#### **4.7.3 Tecnologías para la producción de hongos**

Los métodos de producción varían considerablemente. Muchos están basados en fermentaciones sobre sustrato sólido con granos de cereales donde el arroz es el más universal. Otros usan sustratos no nutritivos como gránulos de arcilla. Algunos producen conidios aéreos en la superficie de cultivos líquidos estáticos. Otras tecnologías se desarrollan en tanques de fermentación para obtener productos a base de micelio, blastoesporas o conidios sumergidos.

En general, los tipos de cultivo más comúnmente utilizados en la producción de hongos se pueden clasificar en cultivos bifásicos y cultivos líquidos agitados o fermentaciones líquidas.

#### **4.7.3.1 Cultivos bifásicos**

En este tipo de cultivo se desarrolla el inóculo en líquido agitado y luego se pasa al soporte sólido. En los sistemas bifásicos siempre se debe optimizar el cultivo de la fase líquida para que promueva un rápido crecimiento del aislado. Es el más utilizado a nivel mundial, se obtienen estructuras infectivas de alta calidad y se acorta el tiempo cuando la fase líquida se hace por cultivo líquido agitado.

Un amplio rango de sustratos sólidos está disponible para su uso en la producción de hongos entomopatógenos para el control biológico. La selección del sustrato depende de varios factores, incluyendo la disponibilidad, costos y preferencia del aislado. Un sustrato ideal es aquel que proporciona grandes espacios para la aireación, que mantiene sus partículas individuales separadas después de la hidratación y esterilización para proveer espacios entre partículas y la formación de conidios. Las partículas de los sustratos que son agrupadas cuando se agrega el agua, reducen el área superficial y limitan el espacio donde la esporulación puede ocurrir. Los sustratos sólidos pueden ser nutritivos o inertes. Una de las ventajas ofrecidas por el uso de sustratos inertes es la oportunidad de agregar los nutrientes al sustrato para la esporulación óptima del aislado (Jenkins *et al.*, 1998).

Los cereales y los residuos agroindustriales son los sustratos nutritivos más utilizados en la producción de hongos entomopatógenos, aunque estos permiten menos control sobre el ambiente nutricional. Durante el crecimiento y la esporulación, los hongos utilizan una cierta cantidad de nutrientes suministrados por estos granos y residuos (Dalla *et al.*, 2005).

El sustrato nutritivo comúnmente seleccionado para la producción de conidios de hongos es el arroz (*Oryza sativa* L.) debido a su balance nutricional, costos amplia disponibilidad a nivel mundial, características físicas como el tamaño del grano, propiedades de hidratación e integridad estructural después de ser colonizado por el hongo (Jenkins *et al.*, 1998). Sin embargo se han probado otros cereales para inducir la propagación masiva de hongos entomopatógenos como por ejemplo: cebada (*Hordeum vulgare* L.), avena (*Avena sativa* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), trigo (*Triticum spp.*) y soya (*Glycine max* L.) (Figueroa *et al.*, 2007).

#### **4.7.3.2 Cultivos líquidos agitados o fermentaciones líquidas**

Este tipo de cultivos poseen un alto grado de automatización del proceso, son muy rápidos, pero tienen como desventaja que muchos aislados tienden a crecer como pellets miceliales. En este tipo de cultivos tienden a formarse abundantes blastoesporas. En estos sistemas se logra un óptimo aprovechamiento de los nutrientes. Pueden llegar hasta niveles industriales.

Uno de los aspectos a considerar para el incremento de la utilización de los agentes microbianos de control biológico es el mejoramiento de la eficiencia de los procesos de producción masiva, lo que debe incluir la optimización de los métodos de cultivo (Lacey *et al.*, 2001). La optimización de un medio líquido que garantice el rápido crecimiento de un determinado aislamiento es uno de los pasos en el desarrollo de un procedimiento de producción masiva. Estos medios deben contener fuentes de carbono y de nitrógeno, así como microelementos y factores de crecimiento (Jenkins *et al.*, 1998; Fargues *et al.*, 2002).

Una forma especial de cultivo con tecnología avanzada lo constituyen las fermentaciones en estado sólido que han dado la oportunidad a la industria de desarrollar producciones de bioplaguicidas en biorreactores sellados con un grado alto de automatización, con principios similares a aquellos de la fermentación líquida, lo que reduce costos de mano de obra y permite un control eficiente del proceso de producción donde se logra biomasa de alto valor infectivo y más resistente a condiciones ambientales adversas. En estos sistemas también se logra un óptimo aprovechamiento de los nutrientes pero la inversión de capital inicial es muy alta.

#### **4.8 Actividad tóxica de hongos entomopatógenos sobre *Diaphorina citri***

Subandiyah *et al* (2000) reportaron ensayos a nivel laboratorio con una cepa de *P. fumosoroseus* aislada de adultos de *D. citri* infectados. Se asperjaron suspensiones de esporas de  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  sobre plántulas de cítricos y una vez seco el follaje se introdujo de 5 a 10 adultos de *D. citri*. Las macetas de plántulas fueron examinadas diariamente para comprobar la supervivencia y la infección por hongos hacia los insectos, reportándose a los seis días mortalidades de 10%, 35 % y 55.6 %.

Padulla y Alves (2009), realizaron bioensayos a nivel laboratorio con tres cepas de *B. bassiana*, provenientes de insectos infectados, a una concentración de  $5 \times 10^7$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ , obteniendo mortalidades en el rango del 54-72 % a los siete días de aplicación.

En otro estudio Mellín-Rosas *et al* (2009) evaluaron cepas de *I. fumosorosea*, *M. anisopliae* y *B. bassiana* aisladas de *Bemisia sp* y *Aenolamia sp.* a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ , obtuvieron

mortalidades de 80.79 a 90.00 % para las cepas de *I. fumosorosea*, de 76.09 a 79.49 % para cepas de *M. anisopliae*, y para *B. bassiana* las mortalidades oscilaron entre 16.44 y 30.40 %.

Avery *et al* (2009) probaron la infectividad y transferencia horizontal de *Isaria fumosorosea* Wize entre *Diaphorina citri*. En el bioensayo usaron una hoja despegada, rociaron  $1.2 - 1.7 \times 10^3$  blastosporas/mm<sup>2</sup> sobre secciones de hojas de cítricos o sobre etiquetas plásticas de color amarillo (superficie de atrayente artificial). La mortalidad causada por *I. fumosorosea* para el adulto del psílido ocurrió a los  $4.9 \pm 0.21 - 6.1 \pm 0.37$  días después de exponerlo al patógeno.

La tasa de colonización de *I. fumosorosea* sobre los adultos en las cámaras con secciones de hojas no tratadas y con una etiqueta amarilla tratada fue tan efectiva en inducir mortalidad como en las cámaras con una sección de hoja tratada a los 8 días después de la aplicación. El mismo fenómeno, de la infección del psílido y el esparcir el hongo a hojas no tratadas fue observado cuando los psílicos fueron puestos en cámaras con una etiqueta amarilla tratada.

Hoy *et al* (2010) realizaron bioensayos a nivel laboratorio con una nueva cepa de *Isaria fumosorosea* aislada de cadáveres de insectos adultos de *D. citri*. Psílicos adultos fueron asperjados con esporas a los 28°C, los valores obtenidos del tiempo letal (TL<sub>50</sub>) fueron de 111 y 102.5 h a la concentración de esporas de  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  esporas mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Después de 192 h, el valor de CL<sub>50</sub> fue de  $6.8 \times 10^5$  esporas mL<sup>-1</sup> y la CL<sub>99</sub> fue de  $2.2 \times 10^8$  esporas mL<sup>-1</sup>.

Sánchez- González *et al* (2011) evaluaron la efectividad en campo de cuatro hongos entomopatógenos contra *Diaphorina citri*, mismos que se seleccionaron con base en la virulencia; fueron tres cepas de *Isaria fumosorosea* Pf15, Pf17 y Pf21 y una de *Metarhizium anisopliae* Ma59. En el estudio, la mortalidad obtenida varió de 47.90 a 90.34%, y con base en el análisis estadístico la cepa que presentó mayor porcentaje de mortalidad fue la cepa Pf21 con 90.72 %, seguida de Ma59 con 72.82 % y Pf17 con 58.29%, mientras que Pf15 registró la mortalidad más baja con 47.90%. Considerando mortalidad por micosis comprobada, las cepas Pf21 con 59.79 % y la Pf17 con 45.93% mostraron los mejores resultados seguidas de las cepas Pf17 con 15.64 % y Ma59 con 7.40%.

Lezama-Gutiérrez *et al* (2012) reportaron la actividad de diferentes cepas de *M. anisopliae*, *Cordyceps bassiana* e *I. fumosorosea* contra ninfas y adultos de *D. citri* bajo condiciones de campo. Las cepas fueron aplicadas a una concentración de  $2 \times 10^{13}$  conidias por hectárea con un intervalo de 15 días entre aplicaciones. El porcentaje de control de *C. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* fue de 60, 50, 40 y 35 % en ninfas y 50, 50, 42 y 22 % en adultos, respectivamente. *M. anisopliae*, *C. bassiana* e *I. fumosorosea* aplicados en huertos de limón persa fueron más efectivos en reducir las altas densidades de ninfas que de adultos de *D. citri*.

Stauderman *et al* (2012) desarrollaron ensayos de laboratorio para evaluar cepas de *I. fumosorosea* contra *D. citri*, reportando hasta el 100 % de insectos adultos muertos a concentraciones entre  $10^6$  y  $10^7$  blastoesporas  $\text{mL}^{-1}$  después de 12 días, con valores de  $\text{CL}_{50}$  (a los 7 días post-tratamiento) entre  $1.4 \times 10^5$  y  $2.0 \times 10^6$  blastoesporas  $\text{mL}^{-1}$ . Las tasas de micosis fueron dependientes de la dosis alcanzando hasta el 100% de esporulación en cadáveres a  $10^8$  blastoesporas  $\text{mL}^{-1}$  y declinando a bajas concentraciones.

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Reactivos y material biológico

Las cepas nativas de hongos entomopatógenos se obtuvieron de suelo de áreas donde se cultivan cítricos en México. En el presente trabajo se seleccionaron 33 aislados (Tabla II) y ocho cepas de colección: GHA, Asdel 139, A-48, A-44 (*B. bassiana*), Pfr-612, Pfr-114 (*I. fumosorosea*), Met (*M. anisopliae*) pertenecientes a la colección del Instituto de Biotecnología, FCB-UANL, almacenadas en estado criogénico (glicerol al 10 % a -80 °C), además de un aislado de *Hirsutella citriformis* (INIFAP-Hir-1) perteneciente a la colección del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Se trabajó con ninfas y adultos de *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae) para la realización de los bioensayos para evaluar la patogenicidad de los hongos entomopatógenos anteriormente mencionados; mientras que para la sección correspondiente a los bioensayos con adultos de *D. citri* se utilizaron plántulas de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort), mientras que para los bioensayos con ninfas de *D. citri* se utilizaron brotes tiernos de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.). Respecto a los ensayos con insectos benéficos se utilizaron adultos de *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) y larvas de *Ceraeochrysa valida* de primer y segundo instar y *Eremochrysa punctinervis* (Neuroptera: Chrysopidae) de tercer instar.

Para la implementación de la cría de *D. citri* se utilizaron brotes tiernos u hojas maduras de plantas de naranjo agrio, *Citrus aurantium* L., y de naranjo trifoliado, *Poncirus trifoliata* (L.) y plantas de limón Volkameriana (*Citrus volkameriana* V. Ten. & Pasq.).

Para la cría de *Hippodamia convergens* se utilizaron los siguientes ingredientes: azúcar estándar, levadura de cerveza, polen, alga spirulina, ácido sórbico, miel de abeja, agua y huevo congelado de *Sitotroga cerealella* Olivier, y miel de abeja diluida en agua al 80%, mientras que para la cría de *C. valida* y *Eremochrysa punctinervis* se utilizó levadura de cerveza, leche en polvo, azúcar y miel.

Para la sección correspondiente a la selección de medios de cultivo para la producción de conidios en placa se utilizaron los siguientes reactivos: agar papa dextrosa (PDA), peptona de caseína, extracto de levadura, glucosa anhidra, agar dextrosa Sabouraud y agar bacteriológico.

Para la parte de actividad enzimática en placa se utilizaron los siguientes reactivos:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , KCl,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , glucosa, agar bacteriológico, agar leche descremada,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ , quitina coloidal, agar papa dextrosa, NaCl y Tween 20.

Para el punto de producción de conidios en sustrato sólido se utilizó grano de arroz (*Oryza sativa* L.), caldo dextrosa Sabouraud y caldo papa dextrosa.

Para la conservación de los aislados y cepas se utilizó glicerol al 10 %. Para la activación de los aislados y/o cepas se utilizó agar papa dextrosa, para la preparación de las suspensiones de conidios se utilizó Tween 80 al 0.1 % (v/v) y para la viabilidad se utilizó agar papa dextrosa y azul algodón lactofenol.

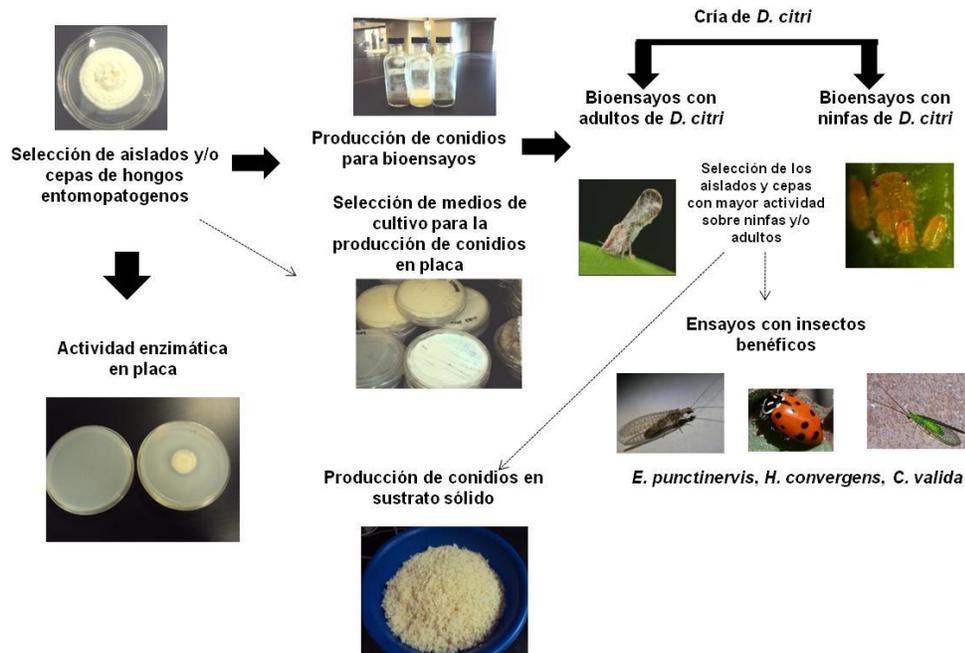
## 5.2 Equipo

Los equipos utilizados para el desarrollo del presente trabajo se describen a continuación: Campana de flujo laminar (Labconco<sup>®</sup> Corp. Bioseguridad II), Refrigerador (Whirlpool<sup>®</sup>), Placa de calentamiento con agitación magnética (Thermolyne Cimarec 3), Potenciómetro (Beckman Instruments  $\Phi$ <sup>™</sup> 390), Balanza semi-analítica (Mettler Toledo<sup>®</sup> International Inc. PG4402-S), Balanza analítica (Mettler Toledo<sup>®</sup> International Inc. AB204), aspersor manual (Thermo Scientific Nalgene<sup>®</sup> modelo 15-232-8), Incubadora (Thermo Scientific Precision<sup>™</sup>), Baño metabólico sin agitación (Thermo Scientific Precision<sup>™</sup>), Vortex (MaxiMix\* II vortex mixer Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup> Inc. y VWR Minivortexer VWR<sup>®</sup> International), Autoclave (All American<sup>®</sup> pressure sterilizer 1925 X), Microscopio estereoscópico (Olympus<sup>®</sup> 52H- 1LLK), Cámara de video Hitachi<sup>®</sup> Ltd. KDP-51 conectada a un microscopio Olympus<sup>®</sup> CX 30, Microscopio (Olympus<sup>®</sup> CHK2-F3-100), Shaker rotatorio (New Brunswick Scientific<sup>®</sup> Co.), Cámara bioclimática, Congelador (Torrey<sup>®</sup>), Centrifuga Allegra (Beckman Coulter<sup>®</sup> Inc. 21R), Centrifuga (Beckman Coulter<sup>®</sup> Inc. J2-21).

Para el procesamiento de datos y esquemas se empleó una computadora Compaq presario MV540 (Compaq), el procesador de texto Microsoft Word XP (Microsoft Corporation, 2007), el procesador de gráficos Microsoft Power Point XP (Microsoft Corporation, 2007) y la hoja de cálculo Microsoft Excel XP (Microsoft Corporation, 2007). Para los cálculos estadísticos se utilizó el programa estadístico IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> v.19 Inc., NY., EE.UU.

## 5.3 Estrategia experimental

En la Figura 4 se ilustra el diagrama general de la estrategia experimental.



**Figura 4.** Representación esquemática de la estrategia experimental.

Para los experimentos realizados en el presente trabajo se seleccionaron aislados y cepas de colección de *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Metharizium anisopliae* e *Hirsutella citriformis* para evaluar su patogenicidad sobre ninfas y adultos de *D. citri*; además se evaluó la producción de conidios en placa en cinco diferentes medios de cultivo, actividad enzimática (lipasa, proteasa y quitinasa) en tres diferentes medios de cultivo sólidos para los diferentes aislados y cepas evaluadas en los bioensayos sobre ninfas y adultos de *D. citri*. Finalmente, se realizaron ensayos de seguridad con los insectos depredadores *Eremochrysa punctinervis*, *Ceraeochrysa valida* e *Hippodamia convergens* denominados insectos no-blanco o benéficos que atacan a *D. citri* en su estadio ninfal, utilizando los aislados y/o cepas de hongos entomopatógenos que mostraron mayor patogenicidad sobre adultos y/o ninfas de *D. citri*, además de evaluar su producción en sustrato sólido (*Oryza sativa* L.)

**Tabla II.** Hongos entomopatógenos aislados en suelo donde se cultivan cítricos en diferentes estados de México.

| <b>Clave</b>  | <b>Localidad de colecta</b>   | <b>Especie</b>        |
|---------------|-------------------------------|-----------------------|
| <b>HIB-1</b>  | Guasave, Sinaloa              | <i>B. bassiana</i>    |
| <b>HIB-2</b>  | Ahome, Sinaloa                | <i>B. bassiana</i>    |
| <b>HIB-3</b>  | Ahome, Sinaloa                | <i>B. bassiana</i>    |
| <b>HIB-4</b>  | Ahome, Sinaloa                | <i>B. bassiana</i>    |
| <b>HIB-5</b>  | Ahome, Sinaloa                | <i>B. bassiana</i>    |
| <b>HIB-6</b>  | Guasave, Sinaloa              | <i>B. bassiana</i>    |
| <b>HIB-7</b>  | Ahome, Sinaloa                | <i>B. bassiana</i>    |
| <b>HIB-8</b>  | Tamazunchale, San Luis Potosí | <i>B. bassiana</i>    |
| <b>HIB-9</b>  | Tanquián, San Luis Potosí     | <i>I. fumosorosea</i> |
| <b>HIB-10</b> | Allende, Nuevo León           | <i>B. bassiana</i>    |
| <b>HIB-11</b> | Hualahuises, Nuevo León       | <i>M. anisopliae</i>  |
| <b>HIB-12</b> | Allende, Nuevo León           | <i>M. anisopliae</i>  |
| <b>HIB-13</b> | Tamaulipas                    | <i>B. bassiana</i>    |
| <b>HIB-14</b> | Hidalgo, Tamaulipas           | <i>B. bassiana</i>    |
| <b>HIB-15</b> | Hidalgo, Tamaulipas           | <i>B. bassiana</i>    |
| <b>HIB-16</b> | Ahome, Sinaloa                | <i>B. bassiana</i>    |
| <b>HIB-17</b> | Ahome, Sinaloa                | <i>B. bassiana</i>    |
| <b>HIB-18</b> | Padilla, Tamaulipas           | <i>B. bassiana</i>    |
| <b>HIB-19</b> | Linares, Nuevo León           | <i>I. fumosorosea</i> |
| <b>HIB-20</b> | Hualahuises, Nuevo León       | <i>I. fumosorosea</i> |
| <b>HIB-21</b> | Tikinmul, Campeche            | <i>I. fumosorosea</i> |
| <b>HIB-22</b> | Montemorelos, Nuevo León      | <i>I. fumosorosea</i> |
| <b>HIB-23</b> | Montemorelos, Nuevo León      | <i>I. fumosorosea</i> |
| <b>HIB-24</b> | Montemorelos, Nuevo León      | <i>B. bassiana</i>    |
| <b>HIB-25</b> | Montemorelos, Nuevo León      | <i>B. bassiana</i>    |
| <b>HIB-26</b> | Hampolol, Campeche            | <i>I. fumosorosea</i> |
| <b>HIB-27</b> | Hermosillo, Sonora            | <i>I. fumosorosea</i> |
| <b>HIB-28</b> | Montemorelos, Nuevo León      | <i>I. fumosorosea</i> |
| <b>HIB-29</b> | Montemorelos, Nuevo León      | <i>I. fumosorosea</i> |
| <b>HIB-30</b> | Montemorelos, Nuevo León      | <i>I. fumosorosea</i> |
| <b>HIB-31</b> | Chencolli, Campeche           | <i>I. fumosorosea</i> |
| <b>HIB-32</b> | Padilla, Tamaulipas           | <i>I. fumosorosea</i> |
| <b>HIB-33</b> | Pocyaxum, Campeche            | <i>I. fumosorosea</i> |

## 5.4 Selección de medios de cultivo para la producción de conidios en placa

Con el objetivo de seleccionar la composición de nutrientes más favorable en la producción y crecimiento radial de los conidios de los diferentes hongos entomopatógenos (Tabla II), se probaron cinco medios de cultivo (Tabla III) en placas Petri.

**Tabla III.** Composición de los medios de producción de conidios en placa

| <b>Medio de cultivo</b> | <b>Composición</b>   |
|-------------------------|--|
| Medio A                 | Agar papa dextrosa (PDA): 15 g de agar bacteriológico, 20 g de glucosa, 4 g de infusión de papa                    |
| Medio B                 | Agar papa dextrosa (PDA) suplementado con 0.5 % de peptona de caseína  |
| Medio C                 | Agar papa-dextrosa (PDA) suplementado con 0.5 % de extracto de levadura  |
| Medio D                 | Agar dextrosa - levadura (ADY): 4 % de glucosa anhidra, 1 % de extracto de levadura y 1.5 % de agar bacteriológico |
| Medio E                 | Agar dextrosa - Sabouraud (ADS): 40 g de glucosa, 10 g de peptona especial, 15 g de agar bacteriológico            |

Todos los medios fueron preparados de acuerdo a su propiedad nutritiva adicionando 1 L de agua bidestilada por cada medio, esterilizando a 15 lbs. de presión por 15 minutos.

### 5.4.1 Activación de las cepas

Para la producción de conidios en placa se seleccionaron los aislados HIB-1, HIB-2, HIB-3, HIB-4, HIB-5, HIB-6, HIB-7, HIB-8, HIB-9, HIB-10, HIB-11, HIB-12, HIB-13, HIB-14, HIB-15, HIB-16, HIB-17, HIB-18, HIB-20, HIB-21, HIB-26, HIB-29, HIB-30, HIB-32, HIB-33 y las cepas GHA, Met y

Pfr-612, los cuales se descongelaron a temperatura ambiente en un tiempo aproximado de 30-60 minutos; posteriormente fueron inoculados en forma de estría en medio agar papa dextrosa ( PDA) y se dejaron incubar a una temperatura de 28°C por 14 a 21 días.

#### **5.4.2 Inoculación e incubación de medios de producción**

Para la inoculación de cada uno de los medios de cultivo (Tabla V) se cortaron cuadros de tamaño uniforme de cada uno de los aislados y se colocaron en el centro de cajas petri de 100 x 15 mm. Se incubaron a 25±2°C por 14 días. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron al menos en dos ocasiones. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó la producción de conidios y crecimiento micelial.

##### **5.4.2.1 Evaluación de la producción de conidios**

A cada cepa se le agregaron 10 mL de solución Tween 80 al 0.1 % (v/v) y con ayuda de una asa se realizó un raspado superficial en cada una de las placas con crecimiento abundante para desprender los conidios aéreos y obtener una solución concentrada. Después se realizaron diluciones para determinar la producción de conidios mL<sup>-1</sup> en una cámara de Neubauer.

##### **5.4.2.2 Evaluación del crecimiento micelial**

Transcurridos los 14 días de incubación se midió el diámetro de las colonias en centímetros (cm) utilizando un vernier.

### 5.4.3 Análisis Estadístico

Se realizó un ANOVA y una prueba de separación de medias de Scheffé ( $\alpha=0.05$ ) utilizando el programa estadístico IBM® SPSS® v.19 Inc., N.Y., EE.UU.

## 5.5 Producción de conidios para bioensayos

Para cada uno de los bioensayos con adultos o ninfas de *D. citri* se seleccionaron al azar los aislados correspondientes de acuerdo a la Tabla IV, los cuales fueron inoculados en forma de estría en medio agar papa dextrosa (PDA) y se dejaron incubar a una temperatura de 28°C por un tiempo de 14 a 21 días. Transcurrido el tiempo de incubación, a cada cepa se le agregaron 10 mL de solución Tween 80 al 0.1 % (v/v) y se ajustó la concentración a  $1 \times 10^8$  conidios mL<sup>-1</sup>.

### 5.5.1 Viabilidad

La viabilidad se determinó en cajas petri de 100 x 15 mm que contenían PDA. De cada una de las suspensiones de conidios de las cepas utilizadas se depositó 1 mL y se incubaron a 25 °C durante 18 h. La germinación de los conidios se detuvo al adicionar tres gotas separadas de azul algodón lacto fenol en tres áreas diferentes de la placa. La proporción de células viables se determinó mediante la observación de 100 conidios en cada uno de los tres diferentes campos de visión a 40 x con un microscopio compuesto. El criterio para tomar en cuenta una espora germinada fue cuando se formó un tubo germinativo, tan largo como la mitad del diámetro de la espora. La viabilidad se expresó en porcentaje de germinación (Goettel e Inglis, 1997).

## **5.6 Cría de *Diaphorina citri***

La cría fue proporcionada por el Laboratorio de Investigación en Control Biológico del Campo Experimental General Terán, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), con sede en General Terán, Nuevo León, México (Latitud Norte 24° 44' 30.5"; Longitud Oeste 24° 44' 30.5"; 662 msnm).

Para el establecimiento de la cría de *D. citri* se colectaron adultos que se posaban sobre brotes tiernos u hojas maduras de plantas de naranjo agrio, *Citrus aurantium* L., y de naranjo trifoliado, *Poncirus trifoliata* (L.) establecidos en camas de germinación. Para la colecta se utilizó una aspiradora bucal. Los insectos colectados se depositaban en recipientes de plástico transparente en grupos de 10 insectos; posteriormente se liberaban en partes iguales en cajas de reproducción de dimensiones 48 x 48 x 60 y 60 x 65x 160 cm. Estas se mantuvieron en un cuarto con condiciones controladas, a una temperatura de 26°C, 16:8 horas de luz: oscuridad (L: O). Cada caja contenía dos plantas de limón Volkameriana (*Citrus volkameriana* V. Ten. & Pasq.), las cuales contaban con brotes vegetativos tiernos para que los adultos se alimentaran y reprodujeran. Cuando los brotes maduraron, los insectos fueron recolectados para introducir plantas con nueva brotación.

## **5.7 Bioensayos con adultos de *D. citri***

Para cada uno de los bioensayos con adultos de *D. citri* se seleccionaron al azar los aislados HIB-1, HIB-2, HIB-3, HIB-4, HIB-6, HIB-7, HIB-8, HIB-10, HIB-19, HIB-20, HIB-21, HIB-22, HIB-11, HIB-12, HIB-13, HIB-14, HIB-23 y las cepas GHA y Pfr-612.

### **5.7.1 Bioensayos preliminares con adultos de *D. citri***

Para evaluar la patogenicidad de las cepas de hongos entomopatógenos sobre adultos de *D. citri* se utilizó una serie de cámaras especiales diseñadas para este propósito. Cada una de estas cámaras consistió de contenedores plásticos de dos litros de capacidad con cierre hermético.

A cada uno de estos recipientes se les realizó una ventana en un costado de 9 cm de ancho y 22.5 cm de largo. Esta ventana fue cubierta con malla anti-áfidos para impedir que escaparan los insectos.

Para la evaluación de las diferentes cepas de hongos entomopatógenos se utilizaron dos métodos; aspersión directa a la plántula y aspersión directa a los insectos. Para ambos métodos se colectaron adultos de *D. citri* y se formaron grupos de 10 individuos depositados en botes de plástico con capacidad de 250 mL.

#### **5.7.1.1 Aspersión directa a la plántula**

Se utilizaron plántulas de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort) creciendo sobre el sustrato Sunshine Peat Moss<sup>®</sup> en pequeñas macetas de unisel. Cada una de las macetas fue cubierta con papel estraza para evitar el contacto entre los insectos y el suelo. Cada una de las plántulas fue asperjada directamente con las soluciones de conidios y posteriormente se colocó una plántula por cámara de bioensayo. Finalmente se agregaron 10 insectos adultos de *D. citri* en cada una de las cámaras, y se cerraron herméticamente.

### **5.7.1.2 Aspersión directa a los insectos**

Para el segundo método se asperjó directamente a los insectos; para facilitar la aplicación de las suspensiones, los adultos se mantuvieron en refrigeración y congelación durante 10 minutos. Después de este tiempo recibieron la aspersión de las suspensiones de conidios y posteriormente se colocaron en las cámaras de bioensayo que ya contenían una plántula de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni Hort*) en su interior. Una vez colocados los insectos los recipientes fueron cerrados herméticamente.

En ambos métodos las condiciones de incubación, fueron de 96 horas a una temperatura de 24°C, 52% de humedad relativa (H.R.) y 16:8 horas (h) luz: oscuridad (L:O).

### **5.7.2 Ensayos de supervivencia con adultos de *D. citri***

Debido a la ocurrencia de mortalidad alta en los testigos, se planteó un experimento que consistió en introducir las plántulas utilizadas en la arena experimental dentro de las cámaras de reproducción para que los adultos de *D. citri* se posaran sobre la misma y así evitar la manipulación de los insectos. Para este ensayo se utilizaron cinco cámaras de reproducción donde se colocaron cada una las plántulas, las cuales posteriormente fueron seleccionadas en base al mayor número de adultos en alimentación activa. Se formaron 5 grupos de 40 insectos, los cuales se introdujeron en sus respectivos recipientes y se colocaron en la cámara bioclimática a 26±2°C, H.R. de 60±5% y fotoperiodo de 16:8 h L:O. La revisión de la supervivencia se registró después de 72 horas.

### **5.7.2.1 Aspersión directa a la plántula**

Para el método de aspersión directa a la plántula, cada una de las plántulas fue colocada durante 72 horas en las cajas de reproducción para inducir una infestación natural. Una vez transcurrido este tiempo se seleccionaron las plántulas con un mínimo de 10 insectos adultos en alimentación activa. Las plántulas infestadas fueron colocadas en las cámaras de bioensayo, y una vez colocadas fueron cerradas herméticamente y a través de la ventana de la cámara la plántula fue asperjada con un atomizador manual tipo Nalgene<sup>®</sup> en 3 ocasiones.

### **5.7.2.2 Aspersión directa a los insectos**

Respecto al método de aspersión directa a los insectos, los adultos de *D. citri* fueron colectados en posición de reposo de las cámaras de reproducción utilizando una aspiradora bucal. Posteriormente se formaron grupos de 10 individuos que fueron colocados en recipientes de plástico con capacidad de 250 mL. Para facilitar la aplicación de las suspensiones de conidios, los adultos fueron mantenidos en refrigeración y congelación durante 10 minutos, una vez transcurrido este tiempo los insectos fueron asperjados directamente con un atomizador manual tipo Nalgene<sup>®</sup> en 3 ocasiones (únicamente los insectos que sobrevivieron al tratamiento con frío fueron utilizados para los bioensayos). Una vez asperjados los insectos, fueron colocados en las cámaras de bioensayo que ya contenían en su interior plántulas de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort).

Todas las cámaras de bioensayo fueron incubadas en una cámara bioclimática a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 5\%$  H.R y un fotoperiodo de 16:8 h L:O. La mortalidad de los insectos fue evaluada a los siete días posteriores a la aplicación de los tratamientos.

Se contaron los insectos muertos y se colocaron en cámara húmeda para favorecer la esporulación. Una vez transcurridos siete días en la cámara húmeda, fueron contados los insectos micosados. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y repetidos por lo menos en dos ocasiones bajo las mismas condiciones.

### **5.7.2.3 Análisis Estadístico**

Las tasas de mortalidad fueron corregidas mediante la fórmula de Schneider-Orelli (Ciba-Geigy, 1981). Posteriormente los porcentajes de mortalidad previa transformación angular se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) ( $\alpha= 0.01$ ) y una prueba de comparación de medias mediante la prueba de Scheffé, utilizando el programa estadístico IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> v.19 Inc., NY., EE.UU.

### **5.7.3 Bioensayo por contacto con adultos de *D. citri***

Para los bioensayos de inoculación por contacto se seleccionaron las cepas Asdel 139, A-48, Met, HIB-15, Pfr-612, GHA, *Hirsutella citriformis* (INIFAP-Hir-1), Pfr-114 y A-44. Para integrar la arena experimental se utilizaron plántulas de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort) sembradas en vasos de unicel, con el uso del sustrato Sunshine Peat Moos<sup>®</sup>. Al ras del vaso se cubrió con papel estraza para evitar que existiera contacto entre el insecto y el suelo. Posteriormente se colectaron adultos de *D. citri* de las cámaras de reproducción con ayuda de una aspiradora bucal y se formaron grupos de 10 individuos depositados en botes de plástico con capacidad de 250 mL. Los tratamientos se realizaron por contacto directo de los insectos con esporas de cada una de las cepas.

Los insectos adultos en grupos de diez se mantuvieron en refrigeración y congelación durante 10 minutos; una vez adormecidos los insectos se pusieron en contacto durante 60 segundos con las conidias aéreas de cada una de las cepas cultivadas en el medio agar papa dextrosa.

Una vez transcurrido el tiempo de inoculación se colocaron en las cámaras de bioensayo anteriormente descritas, las cuales adicionalmente se colocaron en una bolsa plástica con un trozo de papel absorbente impregnado con agua destilada. Cada tratamiento incluyó cinco repeticiones por cepa, incluyéndose un testigo absoluto no tratado. Los experimentos se repitieron en al menos dos ocasiones. Las arenas experimentales se mantuvieron por 96 horas a una temperatura constante de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , H.R. de 52% y 16:8 h L:O.

## **5.8 Bioensayos con ninfas de *D. citri***

Para los bioensayos preliminares con ninfas de *D. citri* se seleccionaron al azar los aislados HIB-1, HIB-2, HIB-3, HIB-4, HIB-5, HIB-6, HIB-7, HIB-8, HIB-9, HIB-12, HIB-13, HIB-14, HIB-26, HIB-28, HIB-30, HIB-32, HIB-33 y las cepas Pfr-612 y Met.

### **5.8.1 Bioensayos preliminares con ninfas de *D. citri***

Para integrar la arena experimental se utilizaron brotes tiernos de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) que fueron infestados con ninfas de *D. citri* del segundo al quinto instar, a los cuales se les colocó en el extremo un algodón previamente humedecido en agua destilada para mantener la turgencia del brote. Posteriormente cada brote se colocó en una caja Petri de 100 x 15 mm y se asperjó cada uno de los tratamientos realizándose 10 repeticiones por cada uno, incluyéndose un testigo con solución Tween 80 al

0.1 % (v/v) y un testigo no tratado. La metodología para la activación de las cepas, preparación de la suspensión de conidios y viabilidad fue la anteriormente descrita. Las cajas, una vez cerradas, se colocaron en una cámara bioclimática con temperatura constante a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , H.R de  $60\pm 5$  % y un fotoperiodo de 16:8 (L:O) durante 72 horas.

### **5.8.2 Bioensayos por aspersión con ninfas de *D. citri***

Debido a la ocurrencia de alta mortalidad en los testigos, se planteó efectuar una serie de modificaciones a la metodología inicialmente descrita. Las variaciones consistieron en modificar las condiciones de colecta e incubación. Para integrar la arena experimental se seleccionaron los brotes en base a las condiciones físicas de los mismos, seleccionando solo aquellos que presentaran las mejores condiciones (turgencia, coloración y tamaño). Además solo se utilizaron brotes que estuvieran naturalmente infestados con ninfas de *D. citri* del segundo al quinto instar, a los cuales se les colocó en el extremo un algodón previamente humedecido en agua destilada para mantener la turgencia del brote. Posteriormente cada brote se colocó en una caja Petri de 100 x 15 mm y se asperjó con cada una de las suspensiones de conidios mediante el empleo de un aspersor manual tipo Nalgene<sup>®</sup>, con el cual se efectuaron 10 repeticiones por cada uno de los tratamientos, incluyendo un testigo con solución Tween 80 al 0.1 % (v/v) y un control no tratado.

Las cajas, una vez cerradas, se colocaron en una bolsa plástica con un trozo de papel absorbente impregnado con 1 mL de agua bidestilada para mejorar las condiciones de humedad. Todos los tratamientos fueron incubados en una cámara bioclimática con temperatura constante a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , H.R de  $60\pm 5$  % y un fotoperiodo de 16:8 h (L:O).

La mortalidad de los insectos fue evaluada a los siete días después de la aplicación, se contaron los insectos muertos y micosados. Todos los experimentos fueron repetidos en al menos dos ocasiones bajo las mismas condiciones.

#### **5.8.2.1 Análisis estadístico**

Las tasas de mortalidad fueron corregidas mediante la fórmula de Schneider-Orelli (Ciba-Geigy 1981). Posteriormente los porcentajes de mortalidad previa transformación angular se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) ( $\alpha = 0.01$ ) y una prueba de separación de medias mediante la prueba de Scheffé, utilizando el programa estadístico IBM® SPSS® v.19 Inc., NY., EE.UU.

#### **5.8.3 Bioensayos por método sumergido con ninfas de *D. citri***

Para integrar la arena experimental se seleccionaron brotes tiernos de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) en buenas condiciones (turgencia, coloración y tamaño) infestados con ninfas de *D. citri* del segundo al quinto instar, a los cuales se les colocó en el extremo un algodón previamente humedecido en agua destilada para mantener la turgencia del brote.

Posteriormente cada brote se sumergió en cada una de las suspensiones de conidios de las cepas HIB-1, HIB-2, HIB-3, HIB-4 y HIB-5 a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios mL<sup>-1</sup> durante 30 segundos y luego se colocaron en una caja Petri de 100 x 15 mm las cuales se cerraron herméticamente.

Se efectuaron 5 repeticiones por cada uno de los tratamientos, incluyendo un testigo con solución Tween 20 al 0.1 % (v/v) y un control no tratado. Las cajas, una vez cerradas, se colocaron en una bolsa plástica con un trozo de papel absorbente impregnado con 1 mL de agua bidestilada para mejorar las condiciones de humedad. Los experimentos se repitieron en al menos dos ocasiones.

Todos los tratamientos fueron incubados en una cámara bioclimática con temperatura constante a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , H.R de  $60\pm 5\%$  y un fotoperiodo de 16:8 h (L: O). La mortalidad de los insectos fue evaluada a los cinco días después de la aplicación, se contaron los insectos muertos y micosados.

## **5.9 Actividad enzimática en placa**

Se determinó la actividad de las siguientes enzimas proteasa, quitinasa y lipasa, en placa en tres diferentes medios sólidos: Medio hidrólisis de caseína, medio quitinasas y medio Tween 20, respectivamente.

### **5.9.1 Preparación de la suspensión de conidios**

Para los ensayos para detectar actividad enzimática se seleccionaron los aislados HIB-1, HIB-2, HIB-3, HIB-4, HIB-5, HIB-6, HIB-7, HIB-8, HIB-9, HIB-10, HIB-11, HIB-12, HIB-13, HIB-14, HIB-16, HIB-17, HIB-18, HIB-19, HIB-21, HIB-22, HIB-24, HIB-25, HIB-26, HIB-27, HIB-29, HIB-30, HIB-31, HIB-32, HIB-33 y las cepas GHA, Met, Pfr-612, Pfr-114, Asdel 139, Hir-1, A-44 y A-48 los cuales se descongelaron a temperatura ambiente en un tiempo aproximado de 30-60 minutos; posteriormente fueron inoculados en forma de estría en medio agar papa dextrosa (PDA) y se dejaron incubar a  $28^{\circ}\text{C}$  por un tiempo de 14 a 21 días.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, a cada cepa se le agregaron 10 mL de solución Tween 80 al 0.1 % (v/v) y se ajustó la concentración a  $1 \times 10^6$  conidios mL<sup>-1</sup>.

## **5.9.2 Composición de los medios de cultivo**

### **5.9.2.1 Medio hidrólisis de caseína**

Contiene 0.1 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 % KCl, 0.02 % MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01 % CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 1.0 % glucosa, 1.2 % de agar bacteriológico por litro de agua bidestilada, posteriormente se agregaron 15 % de agar leche descremada resuspendido en 25 mL de agua bidestilada (adaptado de Mata-Villegas, 2008).

### **5.9.2.2 Medio quitinasas**

Contiene 0.13 % NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02 % KCl, 0.02 % MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.02 % CaCl<sub>2</sub>, 1.6 % de agar bacteriológico por 750 mL de agua bidestilada, posteriormente se agregó 20 % de quitina coloidal resuspendida en 250 mL de agua bidestilada (adaptado de Chul-Kang *et al.*, 1999 y Mata-Villegas, 2008).

### **5.9.2.3 Medio tween 20**

De la siguiente composición; 3.9 % de PDA, 0.5 % NaCl, 0.01 % CaCl<sub>2</sub>, 1.5 % de agar bacteriológico por litro de agua bidestilada, posteriormente se agregó 10 % de Tween 20 resuspendido en 90 mL de agua bidestilada (adaptado de Mata-Villegas, 2008).

### **5.9.3 Inoculación e incubación de medios**

Para la inoculación de las cajas petri conteniendo cada uno de los medios para la actividad enzimática se colocó un pequeño círculo de papel filtro estéril en la parte central de cada una de las cajas ; luego se agregó 1  $\mu$ l de suspensión fúngica por caja de cada tratamiento y se incubó a  $25 \pm 2$  ° C. Cada tratamiento se realizó por triplicado y todos los experimentos fueron repetidos en al menos dos ocasiones.

### **5.9.4 Medición de la actividad enzimática**

La medición de la actividad se realizó a las 120 h de incubación. Utilizando un vernier se midió el diámetro de la colonia y el de los halos en milímetros formados alrededor del tratamiento.

### **5.9.5 Interpretación de la actividad enzimática en medios sólidos**

Para la interpretación de las reacciones enzimáticas en medios sólidos (presencia de halos alrededor de la colonia) se utilizó un criterio que relaciona la velocidad de crecimiento y la actividad enzimática utilizando el valor del índice enzimático el cual es igual a : diámetro total de la colonia + halo dividido entre el diámetro de la colonia. Valores de índice enzimático  $>1.0$  indican actividad enzimática (Mustafa and Kaur, 2010).

### **5.9.6 Análisis Estadístico**

Los resultados se analizaron mediante un ANOVA con comparación de medias de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ). Los resultados que no se ajustaron al criterio de normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov fueron analizados

utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para verificar la relación de la mortalidad de *D. citri* con la producción de enzimas se realizó un análisis de regresión múltiple. Los datos fueron analizados mediante el programa IBM® SPSS® v.19 Inc. NY., EE.UU.

## **5.10 Producción de conidios en sustrato sólido**

### **5.10.1 Preparación del precultivo**

Para los ensayos se seleccionaron los aislados HIB-2, HIB-3, HIB-4, HIB-5, HIB-6, Pfr-612 y Pfr-114. Todos los aislados fueron cultivados en agar papa dextrosa durante 14 a 21 días a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Después se prepararon suspensiones de  $10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  con agua destilada estéril para inocular 1000  $\mu\text{L}$  en matraces erlenmeyer bafleados de 250 mL conteniendo 100 mL de caldo dextrosa Sabouraud. Se incubaron por 72 h, a  $28^{\circ}\text{C}$  y 300 rpm en un incubador shaker rotatorio (adaptado de Jackson y Payne, 2007). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron al menos en dos ocasiones.

### **5.10.2 Preparación e inoculación del sustrato**

Se utilizaron bolsas de plástico de alta densidad de 1 kg. En cada bolsa se colocaron 50 g de arroz (*Oryza sativa* L.) y 60% de agua bidestilada, se esterilizaron a  $121^{\circ}\text{C}$ , 15 libras de presión por 15 minutos. Todas las bolsas se inocularon con 1000  $\mu\text{L}$  de cada una de las suspensiones del precultivo tratando de esparcirlas de manera uniforme sobre el sustrato y selladas herméticamente.

Todas las bolsas se incubaron a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por 14 días expuestos a la luz blanca de las lámparas del laboratorio.

Las bolsas fueron agitadas cada tercer día para esparcir las esporas homogéneamente sobre el sustrato. Al final del tiempo de crecimiento se determinó la concentración de conidias y el porcentaje de viabilidad. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron al menos en dos ocasiones (adaptado de Sandoval-Coronado *et al.*, 2010).

#### **5.10.2.1 Medición de la productividad del sustrato**

A los 14 días de incubación se determinó la concentración de conidias por gramo de arroz de cada una de las bolsas, se realizaron las diluciones apropiadas (diluciones  $10^{-6}$  -  $10^{-9}$ ) en solución Tween 80 al 0.1% (v/v) y se midió microscópicamente utilizando una cámara de Neubauer.

#### **5.10.2.2 Pruebas de sobrevivencia**

Se determinó de acuerdo a la viabilidad de los conidios. Se tomó 1 g de arroz y se adicionó a 50 mL de caldo papa dextrosa. Este cultivo se mantuvo en agitación rotatoria durante 6 h a 300 rpm. Al finalizar el tiempo de incubación se realizaron frescos directos de los cultivos y se procedió a contar 100 esporas (germinadas y no germinadas), y así determinar la proporción de esporas viables. El criterio para tomar en cuenta una espora germinada es cuando se forma un tubo germinativo, tan largo como la mitad del diámetro de la espora. La viabilidad se expresó en porcentaje de germinación.

#### **5.10.3 Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como valores promedios  $\pm$  DE. Para verificar la normalidad de los datos se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, previa conversión de los resultados a su logaritmo ( $\log_{10}$ ) para

introducirlas en el programa estadístico, y en caso de cumplir con este parámetro se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para las medias. Los datos fueron analizados mediante el programa IBM® SPSS® v.19 Inc., NY., EE.UU.

## 5.11 Ensayos con insectos benéficos

### 5.11.1 Cría de insectos depredadores

La cría fue proporcionada por el Laboratorio de Investigación en Control Biológico del Campo Experimental General Terán, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), con sede en General Terán, Nuevo León, México (Latitud Norte 24° 44' 30.5"; Longitud Oeste 24° 44' 30.5"; 662 msnm). Para los bioensayos se utilizaron los depredadores *Ceraeochrysa valida* (Banks) y *Eremochrysa punctinervis* (MacLachlan) (Neuroptera: Chrysopidae) e *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae). Especímenes de las diferentes especies fueron reproducidos bajo condiciones controladas en el laboratorio.

Los adultos de *Hippodamia convergens* fueron alimentados con una dieta a base de azúcar estándar, levadura de cerveza, polen, alga spirulina, ácido sórbico, miel de abeja, agua y huevo congelado de *Sitotroga cerealella* Olivier, se incluyó además una esponja de 1 cm<sup>3</sup> saturada con miel de abeja diluida en agua al 80%.

Los adultos de *C. valida* y *E. punctinervis* fueron alimentados con una dieta a base de proteína y carbohidratos (mezcla volumétrica en partes iguales de: levadura de cerveza, leche en polvo, azúcar y miel); el agua fue proporcionada en un vial. Los huevos depositados por las tres especies fueron incubados a 28±1°C con un fotoperíodo de 12:12 h L: O.

### **5.11.2 Preparación de la suspensión de conidios**

Para los bioensayos con insectos benéficos se seleccionaron las cepas que obtuvieron los mejores porcentajes de mortalidad en los ensayos sobre *D. citri* (HIB-2, HIB-3, HIB-4, HIB-5, Pfr-612 y Pfr-114), los cuales se descongelaron a temperatura ambiente en un tiempo aproximado de 30-60 minutos; posteriormente fueron inoculados en forma de estría en medio agar papa dextrosa (PDA) y se dejaron incubar a una temperatura de 28°C por un tiempo de 14 a 21 días. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se ajustó la concentración a  $1 \times 10^8$  conidios mL<sup>-1</sup>. Además se realizaron pruebas de viabilidad de acuerdo a la metodología descrita anteriormente.

### **5.11.3 Bioensayos con *Hippodamia convergens***

Para evaluar la patogenicidad de las cepas de hongos entomopatógenos sobre adultos de *D. citri* se utilizaron adultos de *H. convergens*, los cuales antes de ser tratados se colocaron en refrigeración durante 5 - 10 minutos para facilitar la aplicación de las suspensiones de conidios de hongos entomopatógenos. Una vez adormecidos por la acción del frío, los insectos fueron asperjados con suspensiones de conidios a una concentración de  $1 \times 10^8$  de cada una de los aislados y/o cepas evaluados.

Se utilizaron cinco insectos por tratamiento con cuatro repeticiones por cada uno, además de dos testigos o controles, uno con Tween 80 al 0.1 % (v/v) y uno sin tratar. Todos los tratamientos fueron incubados a temperatura constante de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , y un fotoperiodo de 12:12 h L: O. La mortalidad de los insectos fue evaluada a los 26 días después de la aplicación.

#### **5.11.4 Bioensayos con *Ceraeochrysa valida* y *Eremochrysa punctinervis***

Para evaluar la patogenicidad de las cepas de hongos entomopatógenos sobre larvas de *C. valida* de primer y segundo instar y de *E. punctinervis* de tercer instar, los insectos fueron asperjados con suspensiones de conidios a una concentración de  $1 \times 10^8$  de cada una de los aislados y/o cepas evaluados y se colocaron por separado en cajas petri de 10 x 15 mm.

Se utilizaron catorce insectos por tratamiento, además de dos testigos, uno con Tween 80 al 0.1 % (v/v) y uno sin tratar. Todos los tratamientos fueron incubados a temperatura constante de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , y un fotoperiodo de 12:12 h (L: O). La mortalidad de los insectos fue evaluada durante 28 días.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Evaluación de la producción de conidios

#### 6.1.1 Producción de conidios por efecto del medio de cultivo

La producción promedio de conidios obtenida entre los diferentes medios de cultivo fue de  $6.7 \times 10^6$  a  $5.8 \times 10^9$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ , siendo el mínimo el obtenido para el aislado HIB-3 en el medio A (PDA) y el máximo para el aislado HIB-4 en el medio D (ADY). Sin embargo, de acuerdo a los resultados del ANOVA no existió diferencia significativa ( $F = 0.817$ ;  $p = 0.517$ ) entre los cinco medios evaluados para la producción de conidios por mililitro entre los diferentes aislados y cepas evaluados (Tabla IV).

#### 6.1.2 Producción de conidios entre los aislados y cepas

La producción promedio de conidios obtenida entre los diferentes aislados fue de  $1.85 \times 10^7$  a  $4.85 \times 10^9$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ , reportándose el mínimo para el aislado HIB-3 y el máximo para el aislado HIB-4. El análisis estadístico para la producción de conidios entre las diferentes cepas mostró alta diferencia significativa entre ellas ( $F = 8.727$ ;  $p \leq 0.0001$ ); por lo tanto se realizó una prueba de comparación de medias de Scheffé ( $\alpha = 0.05$ ) reportándose que el aislado HIB-4 presentó la mayor producción con  $4.85 \times 10^9$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ , mientras que los aislados HIB-2, HIB-3 y HIB-29 presentaron la más baja producción de conidios con  $4.70 \times 10^7$ ,  $1.85 \times 10^7$  y  $1.95 \times 10^7$  (Tabla V).

## **6.2 Evaluación del crecimiento micelial**

### **6.2.1 Crecimiento micelial por efecto del medio de cultivo**

El crecimiento micelial obtenido en los diferentes medios de cultivo fue de 3.13 a 8.50 centímetros, reportándose el mínimo para el aislado HIB-18 en el medio B (PDA suplementado con 0.5 % de peptona de caseína) y el máximo para la cepa Met en los medios D y E (ADY y ADS). Sin embargo, de acuerdo a los resultados del ANOVA no existió diferencia significativa ( $F = 1.087$ ;  $p = 0.366$ ) entre los cinco medios evaluados para el crecimiento micelial entre los diferentes aislados (Tabla VI).

### **6.2.2 Crecimiento micelial entre los aislados y cepas**

El crecimiento micelial promedio entre las diferentes cepas fue de 3.62 a 8.06 cm, reportándose el mínimo para el aislado HIB-18 y el máximo para la cepa Met. De acuerdo a los resultados del análisis estadístico el crecimiento micelial entre los diferentes aislados mostró alta diferencia significativa entre ellos ( $F = 24,498$ ;  $p \leq 0,0001$ ) por lo tanto se realizó una prueba de comparación de medias de Scheffé ( $\alpha = 0.05$ ) reportándose que la cepa Met presentó el más alto crecimiento micelial con 8.06 cm, mientras que el aislado HIB-18 el más bajo con 3.62 cm (Tabla VII).

**Tabla IV.** Producción promedio de conidios por efecto de los diferentes medios de cultivo a los 14 días de incubación bajo condiciones de laboratorio ( $25 \pm 2^\circ \text{C}$ ).

| Aislados y/o cepas | Medios de cultivo ( conidios mL <sup>-1</sup> ) |                            |                            |                            |                            |
|--------------------|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                    | A   | B                          | C                          | D                          | E                          |
| HIB-1              | $2.6 \times 10^8$                               | $2.7 \times 10^8$          | $2.1 \times 10^8$          | $3.3 \times 10^8$          | $5.8 \times 10^8$          |
| HIB-2              | $3 \times 10^7$                                 | $2.8 \times 10^7$          | $5.9 \times 10^7$          | $1.8 \times 10^8$          | $2.8 \times 10^7$          |
| HIB-3              | $6.7 \times 10^6$                               | $8.8 \times 10^6$          | $8.8 \times 10^6$          | $5.0 \times 10^8$          | $8.2 \times 10^6$          |
| HIB-4              | $4.1 \times 10^9$                               | $8.6 \times 10^9$          | $3.2 \times 10^9$          | $9.3 \times 10^9$          | $2.8 \times 10^9$          |
| HIB-5              | $3.2 \times 10^8$                               | $3.2 \times 10^7$          | $3.4 \times 10^8$          | $3.4 \times 10^8$          | $3.5 \times 10^8$          |
| HIB-6              | $1.6 \times 10^9$                               | $2.0 \times 10^9$          | $4.8 \times 10^9$          | $5.8 \times 10^9$          | $5.2 \times 10^9$          |
| HIB-7              | $2.0 \times 10^8$                               | $2.7 \times 10^8$          | $2.0 \times 10^7$          | $2.0 \times 10^8$          | $2.0 \times 10^8$          |
| HIB-8              | $2.2 \times 10^7$                               | $3.5 \times 10^7$          | $2.4 \times 10^7$          | $1.5 \times 10^8$          | $2.3 \times 10^8$          |
| HIB-9              | $2.3 \times 10^8$                               | $2.2 \times 10^8$          | $4.5 \times 10^8$          | $4.6 \times 10^8$          | $6.1 \times 10^8$          |
| HIB-10             | $3.4 \times 10^8$                               | $3.3 \times 10^8$          | $3.6 \times 10^8$          | $3.9 \times 10^8$          | $2.9 \times 10^9$          |
| HIB-11             | $1.2 \times 10^9$                               | $4.2 \times 10^9$          | $1.2 \times 10^9$          | $1.1 \times 10^8$          | $1.6 \times 10^8$          |
| HIB-12             | $2.6 \times 10^9$                               | $2.1 \times 10^9$          | $3.2 \times 10^9$          | $1.4 \times 10^8$          | $1.2 \times 10^8$          |
| HIB-13             | $4.4 \times 10^7$                               | $3.0 \times 10^7$          | $5.5 \times 10^7$          | $2.5 \times 10^8$          | $1.3 \times 10^8$          |
| HIB-14             | $6.0 \times 10^8$                               | $4.9 \times 10^7$          | $6.5 \times 10^7$          | $2.8 \times 10^8$          | $2.3 \times 10^8$          |
| HIB-15             | $3.2 \times 10^8$                               | $4.2 \times 10^7$          | $3.2 \times 10^8$          | $2.8 \times 10^8$          | $1.8 \times 10^9$          |
| HIB-16             | $6.5 \times 10^7$                               | $4.4 \times 10^7$          | $3.7 \times 10^7$          | $3.3 \times 10^8$          | $4.0 \times 10^7$          |
| HIB-17             | $3.1 \times 10^8$                               | $5.8 \times 10^7$          | $6.0 \times 10^8$          | $3.9 \times 10^8$          | $3.9 \times 10^8$          |
| HIB-18             | $4.5 \times 10^7$                               | $5.7 \times 10^7$          | $5.1 \times 10^8$          | $5.4 \times 10^7$          | $2.6 \times 10^8$          |
| HIB-20             | $6.8 \times 10^8$                               | $6.3 \times 10^8$          | $4.0 \times 10^8$          | $2.9 \times 10^8$          | $4.5 \times 10^8$          |
| HIB-21             | $2.5 \times 10^8$                               | $1.4 \times 10^8$          | $2.9 \times 10^8$          | $3.9 \times 10^8$          | $1.7 \times 10^8$          |
| HIB-26             | $1.8 \times 10^7$                               | $6.8 \times 10^7$          | $2.7 \times 10^8$          | $5.3 \times 10^7$          | $2.1 \times 10^8$          |
| HIB-29             | $1.8 \times 10^7$                               | $1.7 \times 10^7$          | $2.9 \times 10^8$          | $2.2 \times 10^7$          | $1.5 \times 10^7$          |
| HIB-30             | $2.4 \times 10^7$                               | $1.0 \times 10^7$          | $2.8 \times 10^8$          | $7.7 \times 10^7$          | $2.0 \times 10^8$          |
| HIB-32             | $2.3 \times 10^8$                               | $3.5 \times 10^8$          | $4.0 \times 10^8$          | $1.4 \times 10^8$          | $4.1 \times 10^8$          |
| HIB-33             | $5.0 \times 10^7$                               | $6.3 \times 10^7$          | $3.3 \times 10^7$          | $2.9 \times 10^7$          | $2.6 \times 10^8$          |
| GHA                | $2.6 \times 10^8$                               | $2.0 \times 10^8$          | $3.4 \times 10^8$          | $5.5 \times 10^8$          | $1.6 \times 10^8$          |
| Pfr-612            | $1.05 \times 10^8$                              | $1.0 \times 10^8$          | $1.82 \times 10^8$         | $1.66 \times 10^8$         | $2.0 \times 10^8$          |
| Met                | $6.4 \times 10^8$                               | $3.4 \times 10^8$          | $1.8 \times 10^8$          | $1.8 \times 10^8$          | $1.3 \times 10^8$          |
| Promedio $\pm$ DE  | $1.65 \times 10^8 \pm .72$                      | $1.42 \times 10^8 \pm .76$ | $2.05 \times 10^8 \pm .68$ | $2.80 \times 10^8 \pm .59$ | $2.35 \times 10^8 \pm .63$ |

**Tabla V.** Producción promedio de conidios por aislado y/o cepa a los 14 días de incubación bajo condiciones de laboratorio ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

| <b>Aislados y/o cepas</b> | <b>*Conidios mL<sup>-1</sup></b> |
|---------------------------|----------------------------------|
| <b>HIB-1</b>              | $3.10 \times 10^8$ abc           |
| <b>HIB-2</b>              | $4.70 \times 10^7$ a             |
| <b>HIB-3</b>              | $1.85 \times 10^7$ a             |
| <b>HIB-4</b>              | $4.85 \times 10^9$ c             |
| <b>HIB-5</b>              | $2.10 \times 10^8$ abc           |
| <b>HIB-6</b>              | $3.45 \times 10^9$ bc            |
| <b>HIB-7</b>              | $1.38 \times 10^8$ abc           |
| <b>HIB-8</b>              | $5.77 \times 10^7$ ab            |
| <b>HIB-9</b>              | $3.70 \times 10^8$ abc           |
| <b>HIB-10</b>             | $8.70 \times 10^8$ abc           |
| <b>HIB-11</b>             | $6.40 \times 10^8$ abc           |
| <b>HIB-12</b>             | $7.80 \times 10^8$ abc           |
| <b>HIB-13</b>             | $7.55 \times 10^7$ ab            |
| <b>HIB-14</b>             | $1.65 \times 10^8$ abc           |
| <b>HIB-15</b>             | $2.89 \times 10^8$ abc           |
| <b>HIB-16</b>             | $6.70 \times 10^7$ ab            |
| <b>HIB-17</b>             | $4.40 \times 10^8$ abc           |
| <b>HIB-18</b>             | $1.14 \times 10^8$ abc           |
| <b>HIB-20</b>             | $4.68 \times 10^8$ abc           |
| <b>HIB-21</b>             | $2.30 \times 10^8$ abc           |
| <b>HIB-26</b>             | $8.20 \times 10^7$ abc           |
| <b>HIB-29</b>             | $1.95 \times 10^7$ a             |
| <b>HIB-30</b>             | $1.00 \times 10^8$ abc           |
| <b>HIB-32</b>             | $2.85 \times 10^8$ abc           |
| <b>HIB-33</b>             | $6.00 \times 10^7$ ab            |
| <b>GHA</b>                | $2.80 \times 10^8$ abc           |
| <b>Pfr-612</b>            | $1.45 \times 10^8$ abc           |
| <b>Met</b>                | $2.50 \times 10^8$ abc           |
| <b>Promedio ± DE</b>      | $2.00 \times 10^8 \pm .56$       |

\*Tratamientos con diferente letra son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Scheffé ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla VI.** Evaluación del crecimiento micelial promedio por efecto de los diferentes medios de cultivo a los 14 días de incubación bajo condiciones de laboratorio ( $25 \pm 2$  °C).

| Aislados<br>y/o cepas                   | Medio de cultivo (cm)           |                                 |                                 |                                 |                                 |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|   | A                               | B                               | C                               | D                               | E                               |
| HIB-1                                   | 4.21                            | 3.40                            | 3.86                            | 3.85                            | 4.08                            |
| HIB-2                                   | 3.76                            | 4.51                            | 4.15                            | 3.68                            | 3.85                            |
| HIB-3                                   | 4.78                            | 4.21                            | 4.13                            | 4.21                            | 3.66                            |
| HIB-4                                   | 4.53                            | 5.03                            | 4.11                            | 5.76                            | 4.83                            |
| HIB-5                                   | 4.21                            | 4.25                            | 4.23                            | 3.56                            | 4.26                            |
| HIB-6                                   | 4.25                            | 5.33                            | 5.08                            | 6.45                            | 4.83                            |
| HIB-7                                   | 4.76                            | 4.48                            | 3.88                            | 4.18                            | 4.76                            |
| HIB-8                                   | 5.90                            | 5.36                            | 5.01                            | 6.11                            | 5.41                            |
| HIB-9                                   | 7.33                            | 7.56                            | 7.33                            | 7.76                            | 7.48                            |
| HIB-10                                  | 3.48                            | 4.65                            | 5.68                            | 5.10                            | 5.41                            |
| HIB-11                                  | 5.78                            | 5.10                            | 5.71                            | 5.91                            | 5.75                            |
| HIB-12                                  | 5.70                            | 5.75                            | 5.83                            | 6.73                            | 6.20                            |
| HIB-13                                  | 4.18                            | 5.35                            | 5.28                            | 5.36                            | 5.25                            |
| HIB-14                                  | 4.66                            | 4.16                            | 4.86                            | 5.01                            | 4.11                            |
| HIB-15                                  | 5.21                            | 6.28                            | 6.46                            | 5.71                            | 5.48                            |
| HIB-16                                  | 4.28                            | 4.25                            | 4.75                            | 4.53                            | 4.98                            |
| HIB-17                                  | 5.08                            | 5.03                            | 4.90                            | 4.31                            | 5.03                            |
| HIB-18                                  | 3.18                            | 3.13                            | 4.11                            | 3.43                            | 4.23                            |
| HIB-20                                  | 7.36                            | 7.26                            | 8.03                            | 7.46                            | 6.81                            |
| HIB-21                                  | 7.48                            | 7.00                            | 7.18                            | 7.91                            | 7.66                            |
| HIB-26                                  | 6.20                            | 7.28                            | 7.00                            | 6.53                            | 6.63                            |
| HIB-29                                  | 6.16                            | 6.46                            | 7.13                            | 7.76                            | 7.66                            |
| HIB-30                                  | 4.93                            | 6.23                            | 5.78                            | 7.06                            | 7.73                            |
| HIB-32                                  | 5.81                            | 6.31                            | 6.66                            | 7.21                            | 6.98                            |
| HIB-33                                  | 6.08                            | 7.23                            | 7.55                            | 7.83                            | 7.83                            |
| GHA                                     | 4.51                            | 5.70                            | 5.75                            | 6.71                            | 5.53                            |
| Pfr-612                                 | 4.08                            | 5.73                            | 7.08                            | 6.75                            | 5.95                            |
| Met                                     | 7.81                            | 7.70                            | 7.80                            | 8.50                            | 8.50                            |
| <b>Promedio <math>\pm</math><br/>DE</b> | <b>5.20<math>\pm</math>1.24</b> | <b>5.52<math>\pm</math>1.26</b> | <b>5.69<math>\pm</math>1.32</b> | <b>5.90<math>\pm</math>1.52</b> | <b>5.74<math>\pm</math>1.38</b> |

**Tabla VII.** Evaluación de crecimiento micelial promedio por aislado y/o cepa a los 14 días de incubación bajo condiciones de laboratorio ( $25 \pm 2$  °C).

| <b>Aislados<br/>y/o cepas</b> | <b>Crecimiento micelial<br/>(cm)</b> |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| HIB-1                         | 3.88 <sup>ab</sup>                   |
| HIB-2                         | 3.99 <sup>abc</sup>                  |
| HIB-3                         | 4.20 <sup>abc</sup>                  |
| HIB-4                         | 4.85 <sup>abcde</sup>                |
| HIB-5                         | 4.10 <sup>abc</sup>                  |
| HIB-6                         | 5.19 <sup>abcdefg</sup>              |
| HIB-7                         | 4.41 <sup>abcd</sup>                 |
| HIB-8                         | 5.56 <sup>abcdefg</sup>              |
| HIB-9                         | 7.49 <sup>gh</sup>                   |
| HIB-10                        | 4.86 <sup>abcde</sup>                |
| HIB-11                        | 5.65 <sup>abcdefg</sup>              |
| HIB-12                        | 6.04 <sup>bcdefgh</sup>              |
| HIB-13                        | 5.08 <sup>abcdef</sup>               |
| HIB-14                        | 4.56 <sup>abcd</sup>                 |
| HIB-15                        | 5.83 <sup>abcdefgh</sup>             |
| HIB-16                        | 4.56 <sup>abcd</sup>                 |
| HIB-17                        | 4.87 <sup>abcde</sup>                |
| HIB-18                        | 3.62 <sup>a</sup>                    |
| HIB-20                        | 7.38 <sup>fgh</sup>                  |
| HIB-21                        | 7.45 <sup>fgh</sup>                  |
| HIB-26                        | 6.71 <sup>defgh</sup>                |
| HIB-29                        | 7.03 <sup>efgh</sup>                 |
| HIB-30                        | 6.35 <sup>cdefgh</sup>               |
| HIB-32                        | 6.59 <sup>defgh</sup>                |
| HIB-33                        | 7.30 <sup>fgh</sup>                  |
| GHA                           | 5.64 <sup>abcdefg</sup>              |
| Pfr-612                       | 5.92 <sup>abcdefgh</sup>             |
| Met                           | 8.06 <sup>h</sup>                    |
| <b>Promedio±<br/>DE</b>       | <b>5.61±1.2</b>                      |

\*Tratamientos con diferente letra son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Scheffé ( $p \leq 0.05$ ).

Debido a que no existió diferencia significativa entre los medios evaluados para la producción de conidios entre los hongos entomopatógenos utilizados se seleccionó el agar papa dextrosa como medio base para la obtención de inóculo para todos los experimentos.

### **6.3 Viabilidad**

Para tomar una espora como germinada se debe considerar cuando se forma un tubo germinativo, tan largo como la mitad del diámetro de la espora. Con respecto a este parámetro la viabilidad de los conidios utilizados para los bioensayos con ninfas y adultos de *D. citri* fue de  $91.66 \pm 6.74$  %, mientras que para los ensayos con insectos benéficos (*H. convergens*, *C. valida* y *E. punctinervis*) la viabilidad fue de  $95 \pm 5$  %.

### **6.4 Bioensayos con adultos de *Diaphorina citri***

#### **6.4.1 Bioensayos preliminares con adultos de *D. citri***

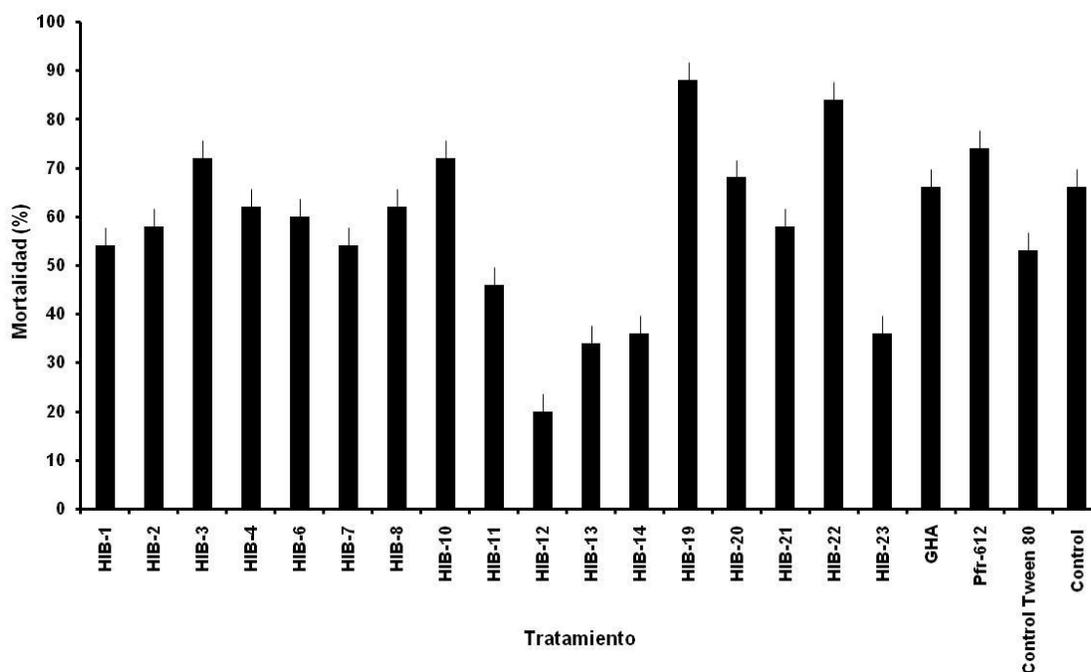
En los ensayos preliminares, los tratamientos evaluados causaron una mortalidad promedio de *D. citri* en el rango de 12-88%.

##### **6.4.1.1 Aspersión directa a la plántula**

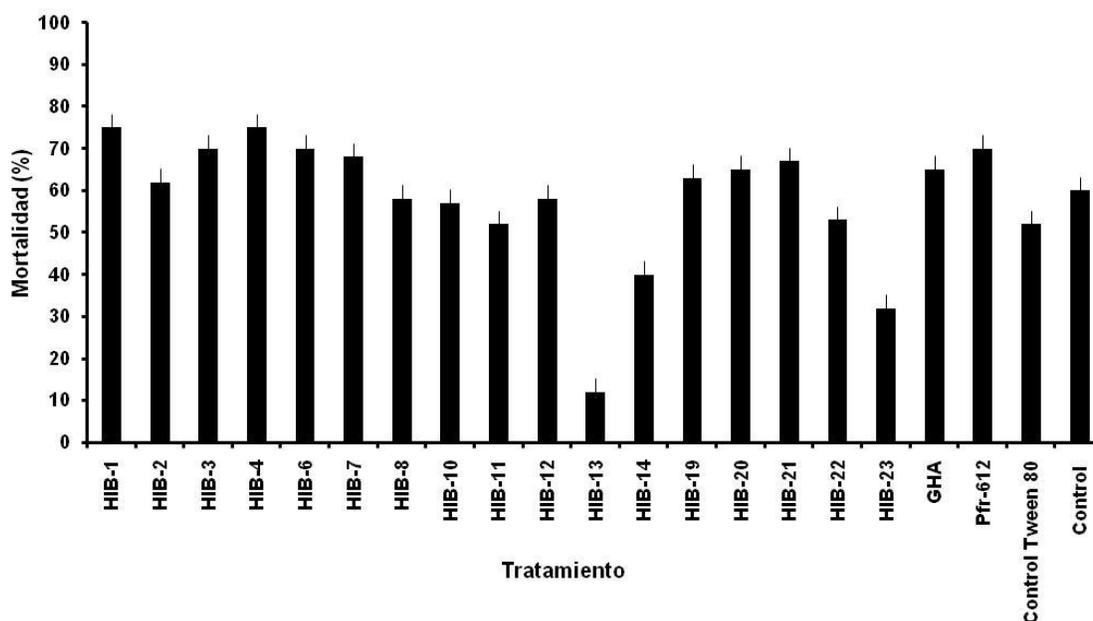
Para el método de aspersión directa a la plántula el valor mínimo de mortalidad se registró para el aislado HIB-12 de *M. anisopliae* (20 %) y el máximo para el aislado HIB-19 de *I. fumosorosea* (88 %) (Figura 5).

### 6.4.1.2 Aspersión directa a los insectos

Para el método de asperjado directo al insecto el valor mínimo se registró para el aislado HIB-13 de *B. bassiana* (12 %) y los máximos para los aislados HIB-1 y HIB-4 de *B. bassiana* (75 %) (Figura 6). Sin embargo para los métodos anteriormente mencionados, los controles utilizados (control Tween 80 y absoluto o no tratado) registraron mortalidades superiores al 50 y 60 %, respectivamente (Figuras 5 y 6).



**Figura 5.** Mortalidad de *D. citri* por aislados y/o cepas de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* mediante el método de aspersión directa a la plántula (HIB-1, HIB-2, HIB-3, HIB-4, HIB-6, HIB-7, HIB-8, HIB-10, HIB-11, HIB-12, HIB-13, HIB-14, GHA, HIB-19, HIB-20, HIB-21, HIB-22, HIB-23 y Pfr-612) bajo condiciones de laboratorio, 24°C; 52% H.R; 16:8 h L: O. Líneas en las barras indican el error estándar.

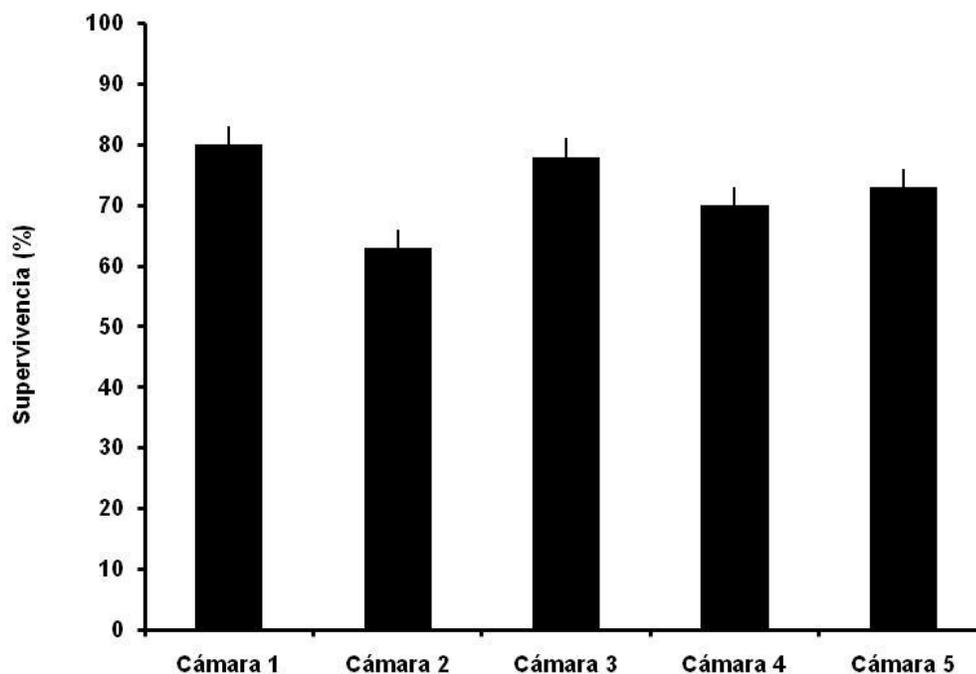


**Figura 6.** Mortalidad de *D. citri* por aislados y/o cepas de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* mediante el método de aspersión directa a los insectos (HIB-1, HIB-2, HIB-3, HIB-4, HIB-6, HIB-7, HIB-8, HIB-10, HIB-11, HIB-12, HIB-13, HIB-14, GHA, HIB-19, HIB-20, HIB-21, HIB-22, HIB-23 y Pfr-612) bajo condiciones de laboratorio, 24°C; 52% H.R; 16:8 h L: O. Líneas en las barras indican el error estándar.

Debido a estos niveles de alta mortalidad en los controles o testigos obtenidos en los experimentos preliminares para la evaluación de los aislamientos nativos y cepas de colección sobre adultos de *D. citri* fue necesario realizar modificaciones y ajustes en la metodología empleada en los experimentos preliminares.

#### 6.4.2 Ensayos de supervivencia con adultos de *D. citri*

En el ensayo de supervivencia en ausencia de los hongos entomopatógenos, la mortalidad mínima fue de 20% y la máxima de 37% (Figura 7).



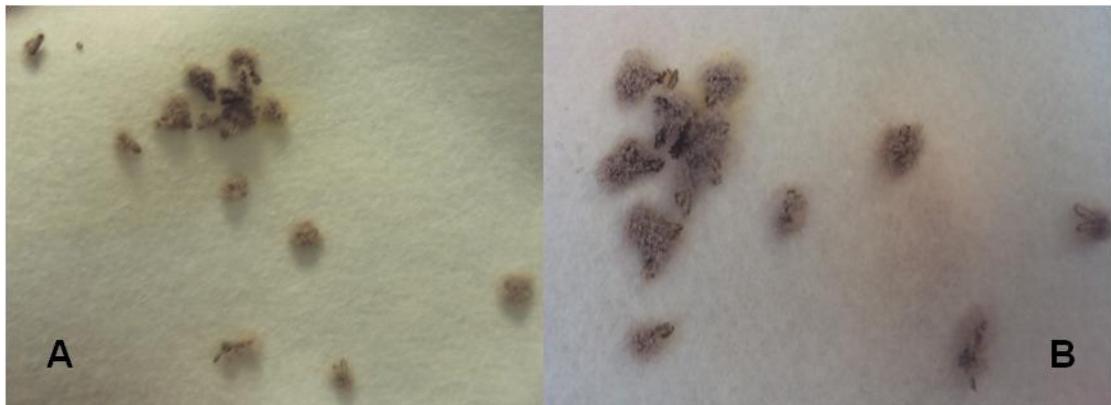
**Figura 7.** Porcentaje de supervivencia de *D. citri* en arenas experimentales sin manipulación del insecto, bajo condiciones de laboratorio,  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ;  $60\pm 5\%$  H.R; 16:8 h L: O. Líneas en las barras indican el error estándar.

#### 6.4.2.1 Aspersión directa a la plántula

Las tasas de mortalidad de adultos de *D. citri* fueron de 33.21 a 62.02 %. Con base en el análisis estadístico se determinó que existió alta diferencia significativa entre los tratamientos ( $F = 10.364$ ;  $p \leq 0.0001$ ) y la prueba de comparación de medias de Scheffé determinó que el aislado HIB-19 de *I. fumosorosea* fue el más efectivo en inducir la mortalidad sobre *D. citri* mediante el método de aspersión directa a la plántula (Figura 8), mientras que el aislado HIB-31 causó la mortalidad más baja (Tabla VIII).

#### 6.4.2.2 Aspersión directa a los insectos

Para este método las tasas de mortalidad de *D. citri* fueron de 34.44 a 60.66 % y con base en el análisis estadístico se determinó que existió alta diferencia significativa entre los tratamientos ( $F = 31.721$ ;  $p \leq 0.0001$ ) y la prueba de comparación de medias de Scheffé determinó que los aislados HIB-24 y HIB-32 de *B. bassiana* e *I. fumosorosea*, respectivamente, fueron los más efectivos en inducir la mortalidad sobre *D. citri* mediante el método de asperjado directo al insecto (Figura 8), mientras que el aislado HIB-22 de *I. fumosorosea* presentó la mortalidad más baja. Las mortalidades promedio registradas para ambos métodos fueron muy similares (Tabla VIII).



**Figura 8.** Mortalidad de *D. citri* por dos diferentes métodos de inoculación. A) Adultos de *D. citri* micosados por el aislado HIB-19 de *I. fumosorosea* mediante el método de aspersión directa a la plántula y B) Adultos de *D. citri* micosados por el aislado HIB-32 de *I. fumosorosea* mediante el método de aspersión directa a los insectos.

**Tabla VIII.** Mortalidad de *D. citri* por aislados y/o cepas de hongos entomopatógenos por dos métodos diferentes de inoculación bajo condiciones de laboratorio (26±2°C; 60±5 % H.R; 16:8 h L: O).

| Aislados y/o cepas   | *Métodos de asperjado directo |                          |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------|
|                      | plántula                      | insectos                 |
| HIB-1                | 37.46 <sup>abc</sup>          | 51.35 <sup>cdefg</sup>   |
| HIB-2                | 40.97 <sup>abc</sup>          | 43.28 <sup>abcde</sup>   |
| HIB-3                | 49.02 <sup>abc</sup>          | 47.29 <sup>abcdefg</sup> |
| HIB-4                | 44.42 <sup>abc</sup>          | 51.35 <sup>cdefg</sup>   |
| HIB-6                | 43.28 <sup>abc</sup>          | 49.02 <sup>abcdefg</sup> |
| HIB-7                | 38.64 <sup>abc</sup>          | 47.86 <sup>abcdefg</sup> |
| HIB-8                | 41.55 <sup>abc</sup>          | 42.70 <sup>abcde</sup>   |
| HIB-10               | 49.60 <sup>abc</sup>          | 40.97 <sup>abcd</sup>    |
| HIB-11               | 37.46 <sup>abc</sup>          | 35.66 <sup>ab</sup>      |
| HIB-14               | 34.44 <sup>ab</sup>           | 35.06 <sup>ab</sup>      |
| HIB-15               | 49.07 <sup>abc</sup>          | 48.45 <sup>abcdefg</sup> |
| HIB-17               | 50.76 <sup>abc</sup>          | 43.28 <sup>abcde</sup>   |
| HIB-19               | 62.02 <sup>c</sup>            | 43.28 <sup>abcde</sup>   |
| HIB-20               | 46.71 <sup>abc</sup>          | 45.00 <sup>abcdef</sup>  |
| HIB-21               | 38.05 <sup>abc</sup>          | 43.28 <sup>abcde</sup>   |
| HIB-22               | 58.05 <sup>abc</sup>          | 34.44 <sup>a</sup>       |
| HIB-23               | 44.69 <sup>abc</sup>          | 40.58 <sup>abcd</sup>    |
| HIB-24               | 51.94 <sup>abc</sup>          | 60.66 <sup>g</sup>       |
| HIB-25               | 41.55 <sup>abc</sup>          | 46.14 <sup>abcdefg</sup> |
| HIB-26               | 56.78 <sup>abc</sup>          | 56.78 <sup>efg</sup>     |
| HIB-27               | 45.00 <sup>abc</sup>          | 42.70 <sup>abcde</sup>   |
| HIB-28               | 42.70 <sup>abc</sup>          | 50.76 <sup>cdefg</sup>   |
| HIB-29               | 50.18 <sup>abc</sup>          | 49.60 <sup>bcdefg</sup>  |
| HIB-30               | 48.47 <sup>abc</sup>          | 45.28 <sup>abcdef</sup>  |
| HIB-31               | 33.21 <sup>a</sup>            | 36.86 <sup>abc</sup>     |
| HIB-32               | 54.33 <sup>abc</sup>          | 60.66 <sup>g</sup>       |
| HIB-33               | 60.66 <sup>bc</sup>           | 54.33 <sup>defg</sup>    |
| GHA                  | 46.16 <sup>abc</sup>          | 45.86 <sup>abcdef</sup>  |
| Pfr-612              | 52.53 <sup>abc</sup>          | 58.05 <sup>fg</sup>      |
| Met                  | 45.00 <sup>abc</sup>          | 49.02 <sup>abcdefg</sup> |
| <b>Promedio ± DE</b> | <b>46.49 ± 7.43</b>           | <b>46.65 ± 7.00</b>      |

\* Mortalidad expresada en porcentaje (%)

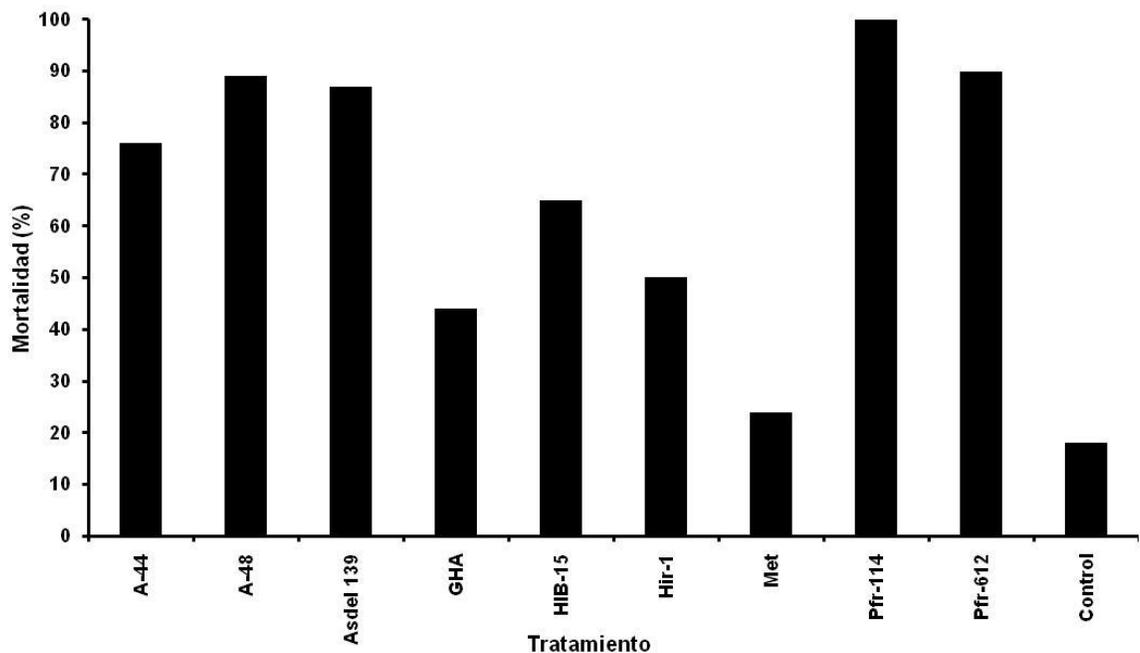
Tween 80 control. Promedio ± DE: 22.64 ± 2.85.

Control no tratado. Promedio ± DE: 23.55 ± 2.64.

Tratamientos con diferente letra son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Scheffé ( $p \leq 0.01$ ).

### 6.4.3 Bioensayo por contacto con adultos de *D. citri*

En el bioensayo por contacto con adultos de *D. citri*, los tratamientos evaluados causaron una mortalidad promedio en un rango de 24-100%, con el valor mínimo registrado para la cepa Met de *M. anisopliae* y el máximo para la cepa Pfr-114 de *I. fumosorosea*. Respecto a las cepas y/o aislados de *B. bassiana*, la cepa GHA mostró un índice de mortalidad del 44 %, mientras que la cepa A-48 obtuvo un 89 %. Para la cepa Pfr-612 se reportó una mortalidad del 90 %, mientras que para la cepa Hir-1 la mortalidad obtenida fue del 50 % (Figura 9).

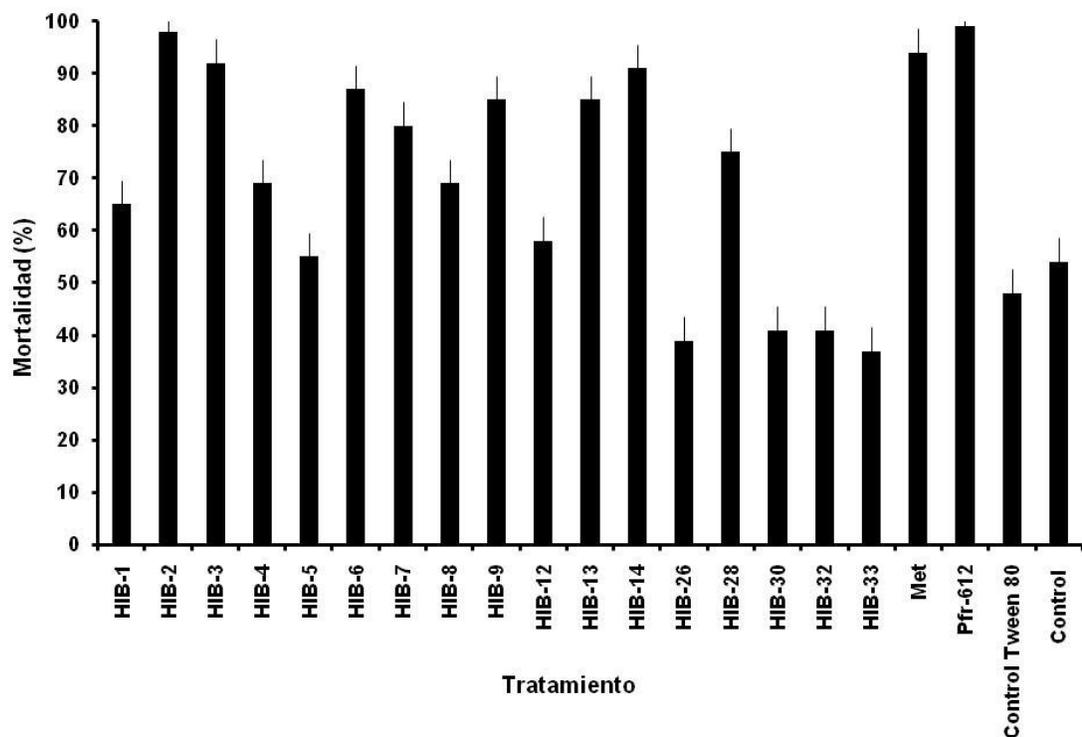


**Figura 9.** Mortalidad de *D. citri* por aislados y/o cepas de *B. bassiana* (A-44, A-48, Asdel 139, HIB-15, GHA), *I. fumosorosea* (Pfr-612, Pfr-114), *M. anisopliae* (Met) e *H. citrifomis* (INIFAP-Hir 1) bajo condiciones de laboratorio,  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ ; 52% H.R; 16 h L: O. Líneas en las barras indican el error estándar.

## 6.5 Bioensayos con ninfas de *D. citri*

### 6.5.1 Bioensayos preliminares con ninfas de *D. citri*

En los ensayos preliminares, los tratamientos evaluados causaron una mortalidad promedio de *D. citri* en el rango de 39-99%, con el valor mínimo registrado para el aislado HIB-26 de *I. fumosorosea* y el máximo para la cepa Pfr-612 de *I. fumosorosea*, sin embargo, los controles utilizados (control Tween 80 y absoluto o no tratado) registraron mortalidades superiores al 48 y 54 %, respectivamente (Figura 10).



**Figura 10.** Mortalidad de ninfas de *D. citri* causada por aislados y/o cepas de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* (HIB-1, HIB-2, HIB-3, HIB-4, HIB-5, HIB-6, HIB-7, HIB-8, HIB-9, HIB-12, HIB-13, HIB-14, HIB-26, HIB-28, HIB-30, HIB-32, HIB-33, Met y Pfr-612 ) bajo condiciones de laboratorio,  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ ;  $60\pm 5\%$  H.R.; 16:8 h L:O. Líneas en las barras indican el error estándar.

Debido a estos niveles de alta mortalidad en los controles o testigos obtenidos en los experimentos preliminares para la evaluación de los aislamientos nativos y cepas de colección sobre ninfas de *D. citri* fue necesario realizar modificaciones y ajustes en la metodología empleada en los experimentos preliminares.

### **6.5.2 Bioensayos por aspersion con ninfas de *Diaphorina citri***

Los resultados muestran que la mortalidad varió de 42.70 a 84.26 % y de acuerdo al análisis estadístico existió alta diferencia significativa entre los tratamientos ( $p \leq 0.0001$ ). La cepa Pfr-612 de *I. fumosorosea* mostró el mayor porcentaje de mortalidad, mientras que las cepas HIB-5 y HIB-25 presentaron el porcentaje más bajo. Respecto a la capacidad de las cepas para inducir micosis, los resultados indican que la cepa HIB-14 de *B. bassiana* fue la que logró inducir micosis con mayor efectividad sobre las ninfas de *D. citri* (Tabla IX).

### **6.5.3 Bioensayos por método sumergido con ninfas de *D. citri***

En bioensayo con ninfas por sumergido, la mortalidad promedio producida por los diferentes tratamientos evaluados se presentó en el rango de 64 - 100%; los valores mínimos se registraron en los testigos (control= 13%; Tween 20= 13%); los valores máximos de mortalidad (100%) fueron causados por los aislados HIB-2, HIB-3, HIB-4, HIB-5 (Figuras 11 y 12).

**Tabla IX.** Efecto de conidios de aislados nativos y cepas de colección de hongos entomopatógenos sobre ninfas de *Diaphorina citri* bajo condiciones de laboratorio (26±2°C, 60±5 % H.R., 16:8 h L: O.)

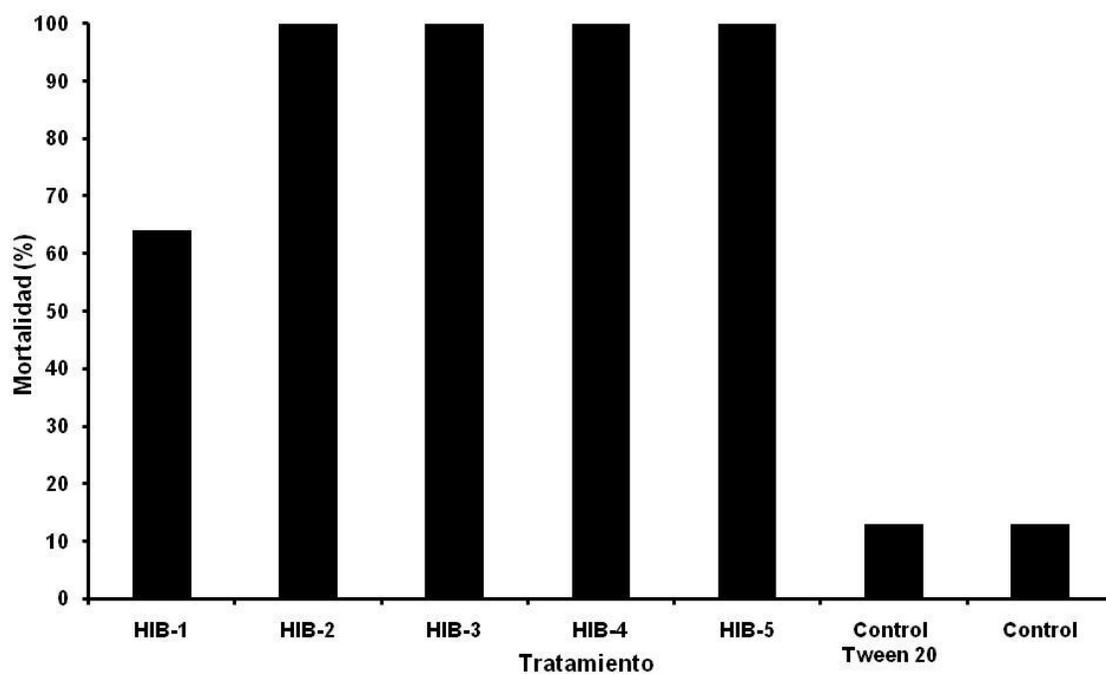
| <b>Aislados y/o cepas</b> | <b>Mortalidad *</b>   | <b>Micosis*</b>       |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>HIB-1</b>              | 48.44 <sup>ab</sup>   | 19.36 <sup>bcde</sup> |
| <b>HIB-2</b>              | 81.86 <sup>hi</sup>   | 39.81 <sup>f</sup>    |
| <b>HIB-3</b>              | 71.56 <sup>fgh</sup>  | 38.05 <sup>f</sup>    |
| <b>HIB-4</b>              | 51.35 <sup>abc</sup>  | 12.92 <sup>b</sup>    |
| <b>HIB-5</b>              | 43.03 <sup>a</sup>    | 15.34 <sup>bcd</sup>  |
| <b>HIB-6</b>              | 67.21 <sup>efg</sup>  | 25.10 <sup>cde</sup>  |
| <b>HIB-7</b>              | 60.66 <sup>cdef</sup> | 18.43 <sup>bcde</sup> |
| <b>HIB-8</b>              | 56.16 <sup>bcd</sup>  | 19.36 <sup>bcde</sup> |
| <b>HIB-9</b>              | 64.89 <sup>defg</sup> | 21.97 <sup>bcde</sup> |
| <b>HIB-12</b>             | 49.60 <sup>ab</sup>   | 14.57 <sup>bc</sup>   |
| <b>HIB-13</b>             | 64.15 <sup>defg</sup> | 46.14 <sup>f</sup>    |
| <b>HIB-14</b>             | 70.63 <sup>fg</sup>   | 56.78 <sup>g</sup>    |
| <b>HIB-23</b>             | 62.02 <sup>cdef</sup> | 25.84 <sup>de</sup>   |
| <b>HIB-24</b>             | 49.02 <sup>ab</sup>   | 21.13 <sup>bcde</sup> |
| <b>HIB-25</b>             | 42.70 <sup>a</sup>    | 16.42 <sup>bcd</sup>  |
| <b>HIB-28</b>             | 56.78 <sup>bcde</sup> | 14.17 <sup>b</sup>    |
| <b>Pfr-612</b>            | 84.26 <sup>i</sup>    | 25.10 <sup>cde</sup>  |
| <b>GHA</b>                | 46.01 <sup>ab</sup>   | 27.40 <sup>e</sup>    |
| <b>Met</b>                | 74.65 <sup>ghi</sup>  | 0.00 <sup>a</sup>     |
| <b>Media±DE</b>           | <b>60.26±12.51</b>    | <b>24.09±13.05</b>    |

\* Mortalidad y micosis expresada en porcentaje (%)

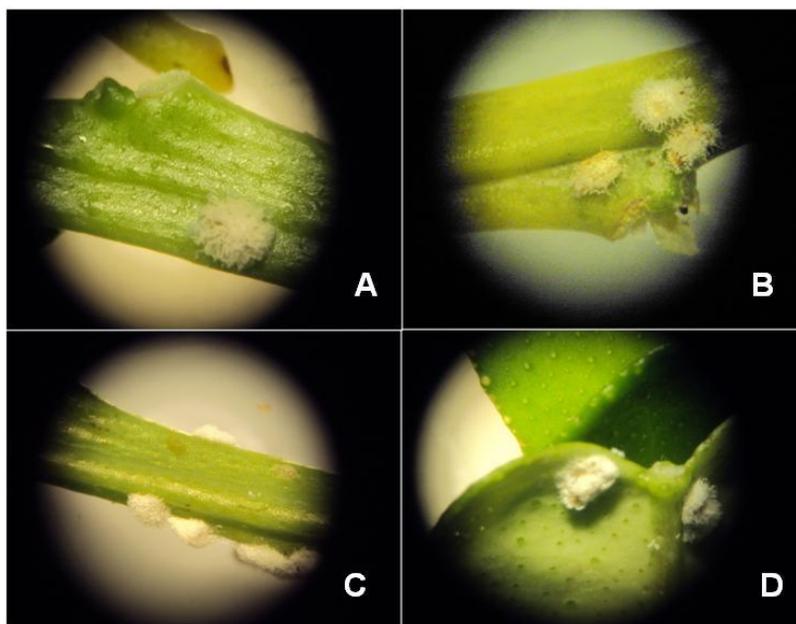
Control Tween 80. Promedio ± DE: 24.05 ± 2.17.

Control no tratado. Promedio ± DE: 22.48 ± 3.22.

Tratamientos con diferente letra son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Scheffé (p ≤ 0.01).



**Figura 11.** Mortalidad de ninfas de *D. citri* causada por aislados de *B. bassiana* (HIB-1, HIB-2, HIB-3, HIB-4 y HIB-5) bajo condiciones de laboratorio,  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ ;  $60\pm 5\%$  H.R; 16:8 h L: O.



**Figura 12.** Ninfas de *D. citri* micadas por *B. bassiana*. A) HIB-2, B) HIB-3, C) HIB-4 y D) HIB-5 mediante el método de sumergido.

## 6.6 Actividad enzimática en placa

Para la actividad proteasa y lipasa los resultados no siguieron una curva normal ( $Z = 2.24$ ,  $p = 0.000$ ) y ( $Z = 3.95$ ,  $p = 0.000$ ) respectivamente, por lo tanto se realizó una prueba de Kruskal-Wallis. De acuerdo con los resultados de esta prueba para la actividad proteasa y lipasa por lo menos uno de los aislados es diferente respecto a su índice enzimático (proteasa:  $\chi^2 = 72.25$ ,  $p = 0.000$ ; lipasa:  $\chi^2 = 56.79$ ,  $p = 0.015$ ). Respecto a la actividad quitinasa los resultados se ajustaron a una curva normal ( $Z = 0.90$ ,  $p = 0.40$ ) y de acuerdo con los resultados del análisis estadístico existió alta diferencia significativa en la actividad quitinolítica de los aislados y cepas evaluadas ( $F = 3.04$ ;  $p \leq 0.0001$ ). La actividad quitinasa se registró en un rango de 1.10-1.50; y de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) el aislado HIB-19 mostró el mayor índice enzimático, seguido por el aislado HIB-1 (Tabla X).

### 6.6.1 Relación de la mortalidad de *D. citri* con la actividad enzimática

Para verificar la relación de la mortalidad de los adultos y ninfas de *D. citri* con la producción de enzimas se realizó un análisis de regresión lineal múltiple.

Para el método de aspersión directa a plántula el coeficiente de correlación ( $R$ ) fue igual a 0.198, mientras que el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de .039, lo que nos indica solo un 3.9 % de asociación dada en la siguiente ecuación:

$$\text{Mortalidad} = 29.90 + 9.69 (\text{lipasa}) - 9.24 (\text{quitinasa}) + 17.13 (\text{proteasa})$$

Con una significancia de la ecuación de  $F = 0.312$ ;  $p = 0.817$ . Estos resultados indican que ninguna de las enzimas evaluadas estima

significativamente la mortalidad de *D. citri* por el método de aspersión directa a la plántula.

Para el método de aspersión directa al insecto el coeficiente de correlación (R) fue igual a 0.348, mientras que el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de .121, lo que nos indica un 12.1 % de asociación dada en la siguiente ecuación:

$$\text{Mortalidad} = 113.97 + 1.22 (\text{lipasa}) - 17.61 (\text{quitinasa}) - 43.77 (\text{proteasa})$$

Con una significancia de la ecuación de  $F= 1.053$ ;  $p = 0.388$ . Estos resultados indican que ninguna de las enzimas evaluadas estima significativamente la mortalidad de *D. citri* por el método de aspersión directa al insecto.

Para el bioensayo por contacto con adultos el coeficiente de correlación (R) fue igual a 0.645, mientras que el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de .416, lo que nos indica un 41.6 % de asociación dada en la siguiente ecuación:

$$\text{Mortalidad} = -196.54 + 61.09 (\text{lipasa}) + 60.55 (\text{proteasa}) + 108.04 (\text{quitinasa})$$

Con una significancia de la ecuación de  $F= 0.712$ ;  $p = 0.607$ . Estos resultados indican que ninguna de las enzimas evaluadas estima significativamente la mortalidad de *D. citri* para el bioensayo por contacto con adultos.

Para los bioensayos con ninfas de *D. citri* mediante el método de aspersión el coeficiente de correlación (R) fue igual a 0.717, mientras que el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de .514, lo que nos indica un 51.4 % de asociación dada en la siguiente ecuación:

Mortalidad = 325.47 – 53.74 (lipasa) + 37.76 (quitinasa) – 245.94 (proteasa)

Con una significancia de la ecuación de  $F= 4.590$ ;  $p = 0.021$ . Estos resultados indican que ninguna de las enzimas evaluadas estima significativamente la mortalidad de *D. citri* por el método de aspersión directa al insecto.

Mientras que para el método de sumergido el coeficiente de correlación (R) fue igual a 0.915, mientras que el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de .838, lo que nos indica un 83.8 % de asociación dada en la siguiente ecuación:

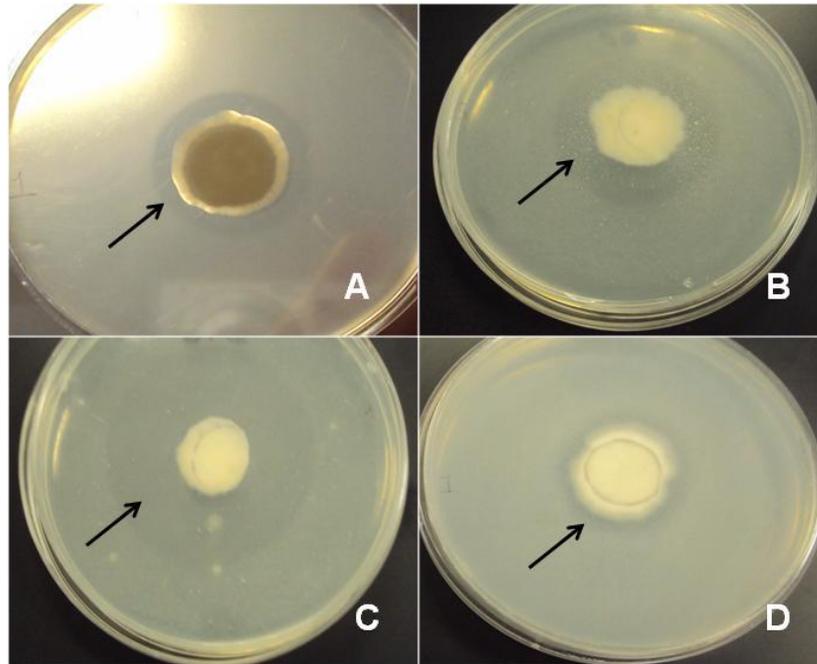
Mortalidad = 780.09 – 81.45 (lipasa) – 548.74 (proteasa) – 23.60 (quitinasa)

Con una significancia de la ecuación de  $F= 1.719$ ;  $p = 0.499$ . Estos resultados indican que ninguna de las enzimas evaluadas estima significativamente la mortalidad de *D. citri* por el método de sumergido de ninfas.

**Tabla X.** Índice enzimático entre los diferentes aislados y cepas de hongos entomopatógenos a las 120 h de incubación bajo condiciones de laboratorio ,25 ± 2 ° C

| Aislados y/o cepas   | Enzimas            |                    |                     |
|----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
|                      | Lipasa             | Proteasa           | Quitinasa*          |
| HIB-1                | 1.24               | 1.05               | 1.45 <sup>bc</sup>  |
| HIB-2                | 1.00               | 1.02               | 1.41 <sup>bc</sup>  |
| HIB-3                | 1.20               | 1.02               | 1.36 <sup>bc</sup>  |
| HIB-4                | 1.25               | 1.00               | 1.12 <sup>ab</sup>  |
| HIB-5                | 1.00               | 1.04               | 1.35 <sup>bc</sup>  |
| HIB-6                | 1.00               | 1.05               | 1.30 <sup>abc</sup> |
| HIB-7                | 1.13               | 1.02               | 1.38 <sup>bc</sup>  |
| HIB-8                | 1.09               | 1.05               | 1.33 <sup>abc</sup> |
| HIB-9                | 1.00               | 1.06               | 1.34 <sup>abc</sup> |
| HIB-10               | 1.56               | 1.04               | 1.29 <sup>abc</sup> |
| HIB-11               | 1.00               | 1.03               | 1.26 <sup>abc</sup> |
| HIB-12               | 1.00               | 1.03               | 1.20 <sup>abc</sup> |
| HIB-13               | 1.12               | 1.04               | 1.36 <sup>bc</sup>  |
| HIB-14               | 1.04               | 1.04               | 1.33 <sup>abc</sup> |
| HIB-15               | 1.13               | 1.03               | 1.33 <sup>abc</sup> |
| HIB-16               | 1.37               | 1.02               | 1.21 <sup>abc</sup> |
| HIB-17               | 1.13               | 1.06               | 1.26 <sup>abc</sup> |
| HIB-18               | 1.00               | 1.05               | 1.43 <sup>bc</sup>  |
| HIB-19               | 1.23               | 1.01               | 1.50 <sup>c</sup>   |
| HIB-21               | 1.00               | 1.04               | 1.31 <sup>abc</sup> |
| HIB-22               | 1.00               | 1.14               | 1.20 <sup>abc</sup> |
| HIB-24               | 1.36               | 1.02               | 1.18 <sup>abc</sup> |
| HIB-25               | 1.14               | 1.05               | 1.16 <sup>abc</sup> |
| HIB-26               | 1.00               | 1.13               | 1.37 <sup>bc</sup>  |
| HIB-27               | 1.06               | 1.08               | 1.28 <sup>abc</sup> |
| HIB-29               | 1.14               | 1.01               | 1.34 <sup>abc</sup> |
| HIB-30               | 1.11               | 1.00               | 1.20 <sup>abc</sup> |
| HIB-31               | 1.00               | 1.14               | 1.25 <sup>abc</sup> |
| HIB-32               | 1.00               | 1.05               | 1.16 <sup>abc</sup> |
| HIB-33               | 1.00               | 1.07               | 1.24 <sup>abc</sup> |
| GHA                  | 1.06               | 1.13               | 1.27 <sup>abc</sup> |
| Met                  | 1.02               | 1.01               | 1.10 <sup>ab</sup>  |
| Pfr-612              | 1.00               | 1.00               | 1.38 <sup>bc</sup>  |
| Pfr-114              | 1.00               | 1.14               | 1.38 <sup>bc</sup>  |
| Asdel 139            | 1.23               | 1.03               | 1.32 <sup>abc</sup> |
| Hir-1                | 1.00               | 1.14               | 1.00 <sup>a</sup>   |
| A-44                 | 1.22               | 1.00               | 1.41 <sup>bc</sup>  |
| A-48                 | 1.22               | 1.02               | 1.15 <sup>ab</sup>  |
| <b>Promedio ± DE</b> | <b>1.10 ± 0.19</b> | <b>1.04 ± 0.05</b> | <b>1.28 ± 0.13</b>  |

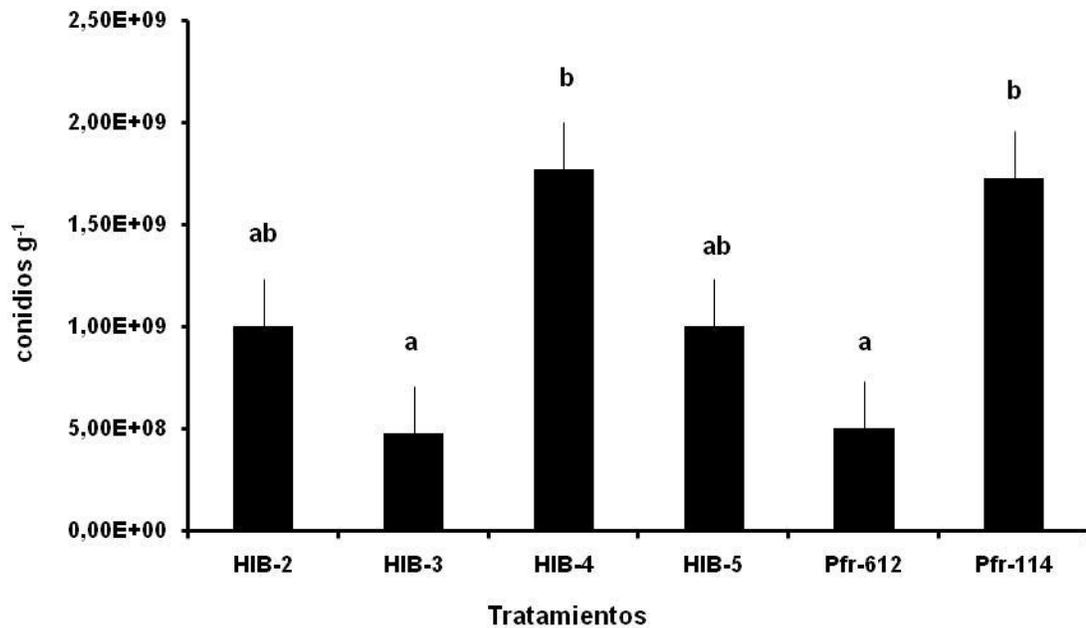
\*Tratamientos con diferente letra son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 13.** Actividad enzimática en placa. A) Actividad lipolítica en medio Tween 20 del aislado HIB-10 de *B. bassiana*, B y C) Actividad quitinolítica en medio quitinasas de los aislados HIB-1 y HIB-19 de *B. bassiana* e *I. fumosorosea* y D) Actividad proteolítica en medio hidrólisis de caseína del aislado HIB-6 de *B. bassiana*. Nótese el halo de inhibición característico en medios de cultivo sólido.

### 6.7 Producción de conidios en sustrato sólido

La producción de conidios en grano de arroz (*Oryza sativa* L.) se presentó entre  $10^8$  a  $10^9$  a conidios  $g^{-1}$  y se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los aislados de *B. bassiana* y las cepas de *I. fumosorosea*. El valor mínimo de  $4.80 \times 10^8$  conidios  $g^{-1}$  se registró para el aislado HIB-3 y el máximo de  $1.77 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  para el aislado HIB-4; los aislados HIB-2 y HIB-5 presentaron una producción promedio de  $1.00 \times 10^9$ , y la cepa Pfr-612 de *I. fumosorosea*  $5.02 \times 10^8$  conidios  $g^{-1}$  (Figura 14).



**Figura 14.** Producción de conidios entre los diferentes aislados de *B.bassiana* (HIB-2, HIB-3, HIB-4 y HIB-5) e *I. fumosorosea* (Pfr-612 y Pfr-114) a los 14 días de incubación bajo condiciones de laboratorio, 25±2°C. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa según la prueba de Scheffé ( $p \leq 0.05$ ). Promedio  $\pm$  DE=  $(9.50 \times 10^8 \pm 0.24$  conidios  $g^{-1}$  de arroz). Líneas en las barras indican el error estándar.

### 6.7.1 Pruebas de sobrevivencia

En las pruebas de sobrevivencia los valores de germinación (Figura 15) en promedio fueron superiores al 90 % a las cuatro semanas de almacenamiento (Tabla XI).

**Tabla XI.** Estabilidad de los conidios de *B. bassiana* (HIB-2, HIB-3, HIB-4 y HIB-5) e *I. fumosorosea* (Pfr-114 y Pfr-612) almacenados a  $4 \pm 2$  °C durante doce semanas.

| Aislados y/o cepas | Germinación (%) |         |       |       |        |       |        |
|--------------------|-----------------|---------|-------|-------|--------|-------|--------|
|                    | *Día 0          | Semanas |       |       |        | Mes   |        |
|                    |                 | 1       | 2     | 3     | 4      | 1     | 2      |
| HIB-2              | 100             | 100     | 100   | 97    | 97     | 90    | 2      |
| HIB-3              | 100             | 100     | 98    | 90    | 80     | 80    | 70     |
| HIB-4              | 100             | 100     | 100   | 100   | 98     | 98    | 95     |
| HIB-5              | 100             | 100     | 100   | 98    | 95     | 90    | 88     |
| Pfr-114            | 100             | 100     | 100   | 100   | 98     | 95    | 98     |
| Pfr-612            | 100             | 100     | 100   | 100   | 97     | 94    | 92     |
| <b>Promedio</b>    | 100             | 100     | 99.66 | 97.50 | 94.16  | 91.16 | 87.50  |
| <b>±DE</b>         |                 |         | ±.81  | ±3.88 | ± 7.02 | ±6.27 | ±10.23 |

Conidios producidos en bolsas de arroz como sustrato sólido a  $25 \pm 2$  °C.

\* Corresponde a la sobrevivencia de las conidias a los 14 d de incubación bajo condiciones de laboratorio ( $25 \pm 2$ °C).

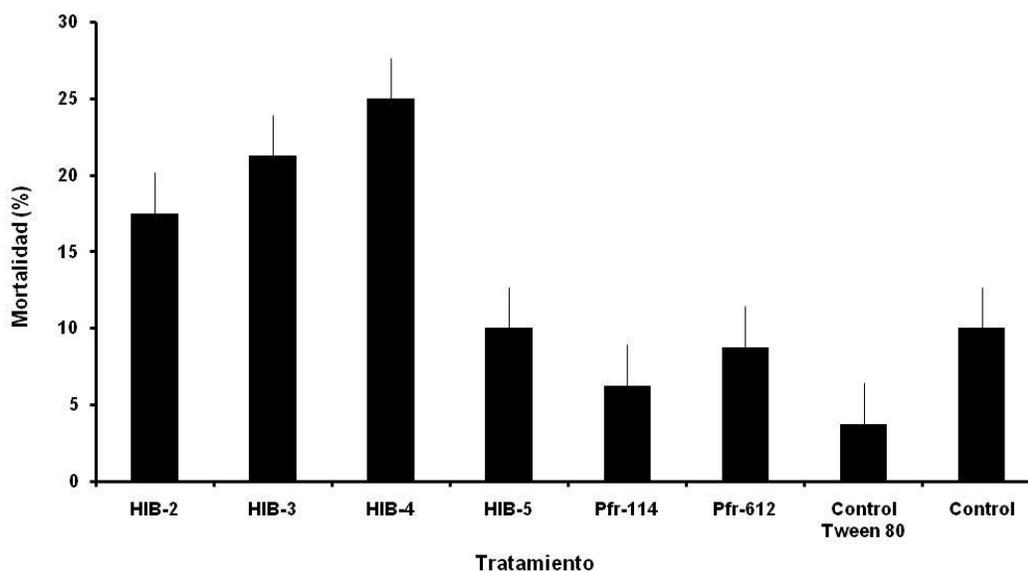


**Figura 15.** Conidios germinados del aislado HIB-4 de *B. bassiana*. Nótese la formación del tubo germinativo, tan largo como la mitad del diámetro de la espóra característico de una espóra germinada.

## 6.8 Ensayos con insectos benéficos

### 6.8.1 Bioensayos con *Hippodamia convergens*

En el bioensayo, los tratamientos evaluados causaron una mortalidad promedio de *H. convergens* en un rango de 6.25-25%, con el valor mínimo registrado para la cepa Pfr-114 y el máximo para el aislado HIB-4, mientras que los controles registraron valores de 3.75 % (Tween 80) y 10 % (control), mientras que los aislados HIB-2, HIB-3 y HIB-5 registraron mortalidades de 17.5, 21.25 y 10 %, respectivamente y para la cepa Pfr-612 se registró un 8.75 % de mortalidad (Figura 16).



**Figura 16.** Mortalidad de *H. convergens* por aislados de *B. bassiana* (HIB-2, HIB-3, HIB-4 y HIB-5) y cepas de *I. fumosorosea* (Pfr-612 y Pfr-114) a los 26 días de incubación bajo condiciones de laboratorio,  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ ; 12:12 h L: O. Líneas en las barras indican el error estándar.

## 6.8.2 Bioensayos con *Ceraeochrysa valida* y *Eremochrysa punctinervis*

### 6.8.2.1 Bioensayos con larvas de tercer estadio de *Eremochrysa punctinervis*

En el bioensayo, los tratamientos evaluados causaron una mortalidad promedio de larvas de tercer estadio de *E. punctinervis* de 0 - 10 %, en pupas de 0-100%, registrándose el valor mínimo para el aislado HIB-5 y el máximo para el aislado HIB-3. Respecto a los adultos las mortalidades por causa de los tratamientos fueron de 10 - 50 % (Tabla XII).

**Tabla XII.** Mortalidad promedio de *Eremochrysa punctinervis* por aislados de *B. bassiana* (HIB-2, HIB-3, HIB-4 y HIB-5) y cepas de *I. fumosorosea* (Pfr-612 y Pfr-114) a los 26 días de incubación bajo condiciones de laboratorio, 28±1°C; 12:12 h L: O.

| Tratamiento      | * Mortalidad X (IC a 95 %) |                  |                  |
|------------------|----------------------------|------------------|------------------|
|                  | Larva 3                    | Pupa             | Adulto           |
| HIB-2            | 10 (7.63-12.37)            | 70 (66.36-73.64) | 10 (7.63-12.37)  |
| HIB-3            | 0                          | 100              | 0                |
| HIB-4            | 0                          | 50 (46.04-53.96) | 40 (36.12-43.88) |
| HIB-5            | 10 (7.63-12.37)            | 0                | 20 (16.84-23.16) |
| Pfr-612          | 10 (7.63-12.37)            | 20 (16.84-23.16) | 30 (26.37-33.63) |
| Pfr-114          | 0                          | 20 (16.84-23.16) | 50 (46.04-53.96) |
| Testigo Tween 80 | 10 (7.63-12.37)            | 10 (7.63-12.37)  | 40 (36.12-43.88) |
| Testigo absoluto | 10 (7.63-12.37)            | 20 (16.84-23.16) | 50 (46.04-53.96) |

\* Mortalidad es expresada en porcentaje (%)

### 6.8.2.2 Bioensayos con larvas de primer estadio de *Ceraeochrysa valida*

En el bioensayo, los tratamientos evaluados causaron una mortalidad promedio de larvas de primer estadio de *C. valida* de 14.28 - 35.70 % registrándose el valor mínimo para el aislado HIB-4 y el máximo para el aislado HIB-3, en pupas de 0-14.28%. Respecto a los adultos las mortalidades por causa de los tratamientos fueron de 14.28 - 49.98 % (Tabla XIII).

**Tabla XIII.** Mortalidad promedio de *Ceraeochrysa valida* por aislados de *B. bassiana* (HIB-2, HIB-3, HIB-4 y HIB-5) y cepas de *I. fumosorosea* (Pfr-612 y Pfr-114) a los 26 días de incubación bajo condiciones de laboratorio, 28±1°C; 12:12 h L: O.

| Tratamiento      | * Mortalidad X (IC a 95 %) |                     |                     |
|------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|
|                  | Larva 1                    | Pupa                | Adulto              |
| HIB-2            | 28.56 (26.49-30.63)        | 0                   | 42.84 (40.57-45.11) |
| HIB-3            | 35.70 (33.50-37.90)        | 7.14 (5.97-8.31)    | 14.28 (12.68-15.88) |
| HIB-4            | 0                          | 0                   | 42.84 (40.57-45.11) |
| HIB-5            | 21.42 (19.54-23.00)        | 7.14 (5.97-8.31)    | 35.70 (33.50-37.90) |
| Pfr-612          | 7.14 (5.97-8.31)           | 14.28 (12.68-15.88) | 14.28 (12.68-15.88) |
| Pfr-114          | 14.28 (12.68-15.88)        | 0                   | 49.98 (47.69-52.27) |
| Testigo Tween 80 | 7.14 (5.97-8.31)           | 7.14 (5.97-8.31)    | 28.56 (26.49-30.63) |
| Testigo absoluto | 14.28 (12.68-15.88)        | 0                   | 35.70 (33.50-37.90) |

\* Mortalidad es expresada en porcentaje (%)

### 6.8.2.3 Bioensayos con larvas de segundo estadio de *Ceraeochrysa valida*

En el bioensayo, los tratamientos evaluados causaron una mortalidad promedio de larvas de segundo estadio de *C. valida* de 0 - 35.70 % registrándose el valor mínimo para el aislado HIB-5 y el máximo para el aislado HIB-3, en pupas de 0 - 7.14%. Respecto a los adultos las mortalidades por causa de los tratamientos fueron de 14.28 - 49.98 % (Tabla XIV).

**Tabla XIV.** Mortalidad promedio de *Ceraeochrysa valida* por aislados de *B. bassiana* (HIB-2, HIB-3, HIB-4 y HIB-5) y cepas de *I. fumosorosea* (Pfr-612 y Pfr-114) a los 26 días de incubación bajo condiciones de laboratorio, 28±1°C; 12:12 h L:O.

| Tratamiento             | * Mortalidad $\bar{X}$ (IC a 95 %) |                  |                     |
|-------------------------|------------------------------------|------------------|---------------------|
|                         | Larva 2                            | Pupa             | Adulto              |
| <b>HIB-2</b>            | 7.14 (5.97-8.31)                   | 7.14 (5.97-8.31) | 49.98 (47.69-52.27) |
| <b>HIB-3</b>            | 35.70 (33.50-37.90)                | 0                | 35.70 (33.50-37.90) |
| <b>HIB-4</b>            | 7.14 (5.97-8.31)                   | 7.14 (5.97-8.31) | 28.56 (26.49-30.63) |
| <b>HIB-5</b>            | 0                                  | 0                | 42.84 (40.57-45.11) |
| <b>Pfr-612</b>          | 21.42 (19.54-23.00)                | 7.14 (5.97-8.31) | 14.28 (12.68-15.88) |
| <b>Pfr-114</b>          | 7.14 (5.97-8.31)                   | 7.14 (5.97-8.31) | 28.56 (26.49-30.63) |
| <b>Testigo Tween 80</b> | 0                                  | 7.14 (5.97-8.31) | 71.40 (69.33-73.47) |
| <b>Testigo absoluto</b> | 0                                  | 7.14 (5.97-8.31) | 28.56 (26.49-30.63) |

\* Mortalidad es expresada en porcentaje (%)

## 7. DISCUSIÓN

Un factor clave en la selección de nuevos aislados como potenciales agentes de control biológico, específicamente en hongos entomopatógenos, es la capacidad de la cepa para ser producida en grandes cantidades (altas tasas de esporulación), tener un rápido crecimiento y no perder su viabilidad e infectividad. La gran mayoría de las especies de hongos pueden producirse fácilmente en medios sólidos, donde el hongo crece en forma de micelio superficial y produce conidios en hifas aéreas; sustratos naturales constituyen medios de cultivo adecuados como el arroz o el salvado de trigo (Goettle and Roberts, 1992; Feng, *et al.*, 1994).

En el presente trabajo se evaluó la producción y crecimiento micelial de aislados nativos de hongos entomopatógenos en diferentes medios de cultivo ampliamente utilizados en el laboratorio para inducir el crecimiento y la esporulación de diversos tipos de hongos, tomando como base el agar papa-dextrosa y el agar dextrosa-Sabouraud los cuales incluyen glucosa como fuente de carbono en diferentes proporciones y tres modificaciones de los mismos por la adición de peptona de caseína y/o extracto de levadura como fuentes de nitrógeno. Los resultados obtenidos mostraron que no existió diferencia significativa entre los medios evaluados para la producción de conidios y crecimiento micelial. Existen, sin embargo, varios factores relacionados con las fuentes de nitrógeno que pudieron tener influencia en los resultados.

Por ejemplo, la peptona de caseína es un digerido pancreático que contiene todos los aminoácidos encontrados en la caseína, además de largas fracciones pépticas, y algunos minerales como calcio, magnesio, potasio y sodio en cantidades mínimas, sin embargo carece de un contenido

definido de vitaminas en su composición, lo cual puede tener efecto en el desarrollo de la esporulación y la formación de estructuras reproductivas las cuales requieren de ciertas concentraciones de vitaminas o minerales (Griffin, 1996).

El extracto de levadura ha demostrado ser una fuente de nitrógeno más eficaz en la promoción del crecimiento micelial y la esporulación, sin embargo, también se ha reportado como un factor limitante para el crecimiento y la esporulación dependiendo de la concentración utilizada. A bajas concentraciones de levadura (0.25 a 0.50%) el crecimiento del micelio es inferior al óptimo y la esporulación es baja, mientras que a mayores concentraciones de levadura (1.75 a 2.0%) el crecimiento del micelio es alto y esto inhibe la esporulación (Vimala-Devi, 1994). La falta o la deficiencia de ciertos factores de crecimiento, tales como vitaminas o minerales, o la concentración de extracto de levadura utilizada en este estudio que fue de 0.5 a 1.0% pudo haber tenido un impacto significativo para la producción de conidios y el crecimiento del micelio.

Moore (1996) menciona que los hongos pueden diferir en su capacidad para utilizar diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para la reproducción, ya que el crecimiento del micelio y la producción de conidios puede ser favorecida por monosacáridos tales como glucosa o fructosa, sin embargo algunas fuentes de nitrógeno que permiten un buen crecimiento del micelio no favorecen la esporulación, tales como asparagina y los compuestos de amonio que inhiben el crecimiento micelial y la esporulación, debido a la acumulación de amoniaco durante el crecimiento somático, por alcalinización del medio inhibiendo este proceso.

En cuanto a la producción de conidios y el crecimiento del micelio entre las diferentes cepas se encontraron diferencias altamente significativas en su capacidad de utilizar diferentes medios de cultivo.

De acuerdo con los resultados reportados, una cepa de *B. bassiana* mostró la mayor producción de conidios entre las cepas analizadas, mientras que otras dos cepas de la misma especie mostraron los niveles más bajos de lo que es consistente con lo reportado por James (2001) que observaron un aumento en la eficiencia de germinación de *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* con la adición de peptona y extracto de levadura. Smith y Grula (1981) informaron que *B. bassiana* requiere fuentes exógenas de carbono para la germinación y de nitrógeno durante las etapas iniciales del crecimiento de las hifas y mantenimiento. Wrona y Gleason (2005) concluyeron que una fuente de carbono puede activar la germinación en algunos microorganismos, pero una fuente de nitrógeno es esencial para la elongación del tubo germinativo y el crecimiento de las hifas. Algunos de los aminoácidos de dichas fuentes nutricionales pueden inducir la expresión de genes que controlan la esporulación, ya que este proceso requiere la activación de más de 80 genes (Roncal y Ugalde, 2003).

Los eventos relacionados con el crecimiento micelial de los hongos, que comienza con la aparición de tubo germinal y finaliza con hifas en crecimiento y su ramificación para formar finalmente un micelio joven, también están relacionados con la genética molecular y la regulación que determina la expresión o represión de las características morfológicas (Papagianni, 2004). Algunos microorganismos no requieren fuentes de nitrógeno para germinar. James (2001) reportó que algunas cepas de *M. anisopliae* germinaron muy bien cuando se utilizó la glucosa como única fuente de nutrición.

Del mismo modo Li y Holdom (1995) observaron que la germinación de los conidios de *M. anisopliae* fueron los mismos en agar con una fuente de nitrógeno (aminoácidos individuales) y agar con glucosa sin ninguna

fuentes de nitrógeno orgánico, e incluso reportaron un buen crecimiento micelial de *M. anisopliae* en almidón soluble para la producción masiva, lo que indica que la respuesta de cada microorganismo es diferente a las distintas fuentes de nutrientes. Estos resultados coinciden con los reportados por la cepa Met de *M. anisopliae*, que tuvo el mayor crecimiento micelial entre las distintas cepas y/o aislados analizados en este estudio.

Varios experimentos se han dedicado a dilucidar la influencia de la nutrición para el crecimiento del micelio y la producción de esporas a fin de elegir los componentes y concentraciones óptimas para aumentar la producción a gran escala. Gao y Liu (2010) examinaron los efectos sobre el crecimiento y la esporulación en medio líquido y sólido para *P. lilacinus* y *M. anisopliae* utilizando distintas combinaciones de fuentes de carbono y nitrógeno diferentes, ellos concluyeron que los resultados fueron muy variables entre las cepas y cada cepa presentó ciertos requisitos de nutrición para el desarrollo del crecimiento micelial y la esporulación. Safavi *et al.* (2007), estudiaron el efecto de la nutrición en la virulencia de tres aislamientos de *B. bassiana* y uno de *M. anisopliae* cultivándolos en siete medios de cultivo con diferentes proporciones de carbono / nitrógeno (C / N).

Ellos reportaron que el crecimiento micelial y la producción de conidios mostró diferencias entre diferentes especies y cepas. Liu y Chen (2002) encontraron que algunas fuentes de carbono y nitrógeno eran buenas para el crecimiento en líquido y sólido de *Hirsutella rhossiliensis*, mientras que algunos no podrían ser utilizados ya sea en forma líquida o sólida.

En el presente estudio se evaluó la producción de conidios de los aislados de *B. bassiana* y cepas de *I. fumosorosea* que indujeron mayor

mortalidad contra ninfas y/o adultos de *D. citri*, mediante el uso de un cultivo bifásico que consistió en un medio líquido para la fase sumergida y grano de arroz (*Oryza sativa* L.) como la fase sólida.

Una gran parte de los hongos entomopatógenos desarrollados sobre grano de arroz como sustrato en bolsas plásticas bajo un sistema de producción artesanal han alcanzado rendimientos del orden de  $10^{10}$  conidios por gramo aunque con frecuencia en la mayoría de las especies los valores reportados son del orden de  $10^9$  conidios por gramo (Wraight *et al.*, 2001; Sahayaraj y Karthick, 2008). Por otro lado, Méndez *et al.*, 2009 reportaron el uso de un cultivo bifásico, en la fase líquida a base de melazas y extracto de lavadura y en la fase sólida grano de arroz como sustrato para la producción de conidios de *Nomuraea rileyi* (Farlow) obteniendo rangos de  $1.05 \times 10^9$  a  $1.68 \times 10^{10}$  conidios  $g^{-1}$ . Rajanikanth *et al.* (2011) usaron grano de sorgo y arroz y obtuvieron valores promedio de  $2 \times 10^{10}$  conidios  $mL^{-1}$ .

Los resultados obtenidos en este estudio se mantuvieron en el orden de  $10^8$  a  $10^9$  conidios  $g^{-1}$ , lo cual coincide con lo reportado por Posada-Flórez, 2008 quien reporta valores menores a  $1 \times 10^{10}$  conidios  $g^{-1}$  de arroz para *B. bassiana* en un medio de cultivo bifásico y una germinación a las 24 y 48 h del 80 y 75 %; mientras que en el presente estudio los valores de germinación en promedio fueron superiores al 90 % a las cuatro semanas de almacenamiento.

Estos rendimientos coinciden también con los reportados por Carneiro and Kulcznski (1993) quienes registraron de  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^{10}$  conidios  $g^{-1}$  de arroz a los 12 días de incubación para aislados de *Paecilomyces spp.* Sin embargo, Monzón (2001) menciona que el rendimiento de esporas por gramo de sustrato está determinado por la cepa y por el estado de la misma y puede variar desde  $5 \times 10^3$  hasta  $2.5 \times 10^{11}$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato.

El presente estudio y las investigaciones anteriores han tratado de ayudar a dilucidar el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno y la relación entre estos elementos como factores de alto impacto en el crecimiento y la esporulación de hongos entomopatógenos y puedan ayudar en la selección de las mejores cepas y/o aislados de hongos entomopatógenos que pueden tener potencial como agentes de control biológico.

De acuerdo a los resultados de los ensayos preliminares anteriormente descritos, tanto para ninfas como adultos los resultados obtenidos muestran que *D. citri* fue afectada por los factores de manejo implementados en la evaluación de los hongos entomopatógenos, ya que la alimentación y condiciones físicas (temperatura y fotoperiodo) provistas se encuentran dentro de los rangos indicados en la literatura (Tsai y Liu, 2000; Tsai *et al.*, 2002). Respecto a los insectos adultos, el ensayo de sobrevivencia ayudó a reducir la mortalidad de los testigos o controles cuando prácticamente la manipulación del insecto fue mínima al propiciar una infestación natural de las plántulas utilizadas en las arenas experimentales, mientras que para las ninfas el seleccionar brotes naturalmente infestados con ninfas en alimentación activa, así como seleccionar los mejores brotes de acuerdo a sus características de coloración, turgencia y tamaño redujo notablemente la mortalidad en los testigos o controles pues de acuerdo a Padulla y Alves (2009) la etapa de transferencia de las ninfas de una planta al brote puede originar daños en el aparato bucal lo que ocasiona que sean incapaces de alimentarse y ser un factor de muerte importante, y al evitar este proceso se reducen las posibilidades de muerte temprana del insecto por esta causa.

Respecto a los bioensayos con adultos de *D. citri* los resultados muestran que *D. citri* fue susceptible a la infección por los aislados de hongos entomopatógenos evaluados. Uno de los objetivos del presente

trabajo fue establecer una metodología uniforme para la selección de hongos entomopatógenos de especies diferentes como agentes de control de *D. citri* mediante el empleo de dos métodos de aplicación diferentes, asperjado directo a plántulas y asperjado directo a los insectos adultos. El método de asperjado directo a plántulas fue diseñado con la finalidad de observar su capacidad para infectar a los insectos evaluados aun y cuando la aplicación de los tratamientos haya sido indirectamente a ellos.

Avery *et al.*, 2009 evaluaron la infectividad y transmisión horizontal de una cepa de *I. fumosorosea* asperjando secciones de hojas de cítricos y etiquetas plásticas de color amarillo (atractivo artificial) con una suspensión de  $1.2 - 1.7 \times 10^3$  blastoesporas por milímetro cuadrado ( $\text{mm}^2$ ) reportando mortalidades del psílido a los  $4.9 \pm 0.21$  y  $6.1 \pm 0.37$  días, respectivamente, después de la exposición al patógeno. Bajo altas condiciones de humedad ( $> 80\%$ ), las blastoesporas de *I. fumosorosea* fácilmente produjeron hifas en la superficie de las hojas, y en las cámaras donde sola una sección de la hoja fue tratada, los adultos al estar en contacto con las blastoesporas fueron capaces de diseminarlas a las hojas no tratadas y el mismo fenómeno ocurrió al usar la etiquetas amarillas. En el presente estudio la humedad relativa fluctuó alrededor del 60 - 65 % y se utilizaron conidios como unidad infectiva los cuales pudieron ser factores claves para que no se haya presentado este fenómeno de auto diseminación.

En un estudio reciente Stauderman *et al.*, 2012 mencionan que en pruebas en invernaderos en condiciones de alta humedad se vieron obstaculizados por la difusión natural de *I. fumosorosea* a psílicos no tratados, lo que sugiere que el hongo es propagado por el movimiento del aire y puede ser altamente eficaz en condiciones muy húmedas.

Respecto al método de asperjado directo a los insectos al igual que para el asperjado de plántulas todos los tratamientos presentaron una mortalidad inferior al 70 %, lo cual coincide con lo reportado por Subandiyah *et al.*, (2000) quienes condujeron un ensayo utilizando tres diferentes concentraciones de conidios de *I. fumosorosea* reportando valores a los 6 días de hasta 55.6 % de mortalidad a una concentración de  $10^8$  conidios mL<sup>-1</sup>.

En otro estudio Mellín-Rosas *et al.*, 2009 evaluaron cuatro cepas de hongos entomopatógenos a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios mL<sup>-1</sup> encontrando a los 10 días de incubación para dos cepas de *I. fumosorosea* mortalidades de 62.71% y 77.38 %. En los bioensayos descritos sobre los estadios ninfales de *D. citri* los resultados obtenidos muestran que es susceptible a la infección por hongos entomopatógenos, lo cual coincide con lo reportado por Padulla y Alves (2009), quienes realizaron bioensayos a nivel laboratorio con tres cepas de *B. bassiana*, provenientes de insectos infectados, a una concentración de  $5 \times 10^7$  conidios mL<sup>-1</sup> y obtuvieron mortalidades en el rango del 54-72 % a los siete días de aplicación. En otro estudio Mellín-Rosas *et al.*, 2009 evaluaron cepas de *I. fumosorosea*, *M. anisopliae* y *B. bassiana* aisladas de *Bemisia sp* y *Aenolamia sp.* a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios mL<sup>-1</sup> obteniendo mortalidades de 80.79 a 90.00 % para cepas de *I. fumosorosea*, de 76.09 a 79.49 % para cepas de *M. anisopliae*, y para *B. bassiana* las mortalidades oscilaron entre 16.44 y 30.40 %. Respecto a la variación en la mortalidad y desarrollo de micosis entre los aislados puede deberse a diversos factores, uno de ellos puede atribuirse al efecto inhibitor de *Cladosporium spp.* (Mellín-Rosas *et al.*, 2011), sin embargo, en bioensayos para la selección de cepas esta variación en la patogenicidad se ha observado en algunos casos y puede estar asociada con la virulencia, especificidad y la tolerancia del huésped como consecuencia de la variabilidad genética de cada uno de estos aislados (Vestergaard *et al.*, 1995; Alves 1998).

Aunque la mayoría de los estudios desarrollados a nivel laboratorio para evaluar la efectividad de diferentes aislados y/o cepas de hongos entomopatógenos sobre *D. citri* difieren notablemente entre sí (Subandiyah *et al.*, 2000; Avery *et al.*, 2009; Mellín-Rosas *et al.*, 2009; Hoy *et al.*, 2010), solo realizan una evaluación cualitativa (Meyer *et al.*, 2007) o están dirigidos a efectuar una descripción morfológica o molecular (Meyer *et al.*, 2007, 2008; Reyes-Rosas *et al.*, 2009; Subandiyah *et al.*, 2000), coinciden con el presente trabajo en que la mayoría de los aislados y/o cepas que han mostrado actividad contra *D. citri* son de *I. fumosorosea* indicando que el insecto es susceptible a la infección causada por este hongo en particular.

En el caso de *I. fumosorosea* la gran mayoría de los experimentos sobre sus efectos secundarios en organismos benéficos se realiza principalmente en relación con el uso de este hongo como agente de control biológico, y en general las cepas de este entomopatógeno resultaron ser compatibles con diversos organismos beneficiosos (Zimmermann, 2008).

Sin embargo, en el caso particular de *D. citri* es importante realizar pruebas de bioseguridad e inocuidad a insectos no blanco, ya que como lo mencionan Quereshi and Stansly (2007) depredadores como *Olla v-nigrum*, *Cycloneda sanguínea* y *Chrysoperla spp* y el mismo *T. radiata* juegan un papel importante como factores de mortalidad natural del psílido. Por lo tanto en el presente trabajo las cepas y/o aislados de *B. bassiana* e *I. fumosorosea* que indujeron mayor mortalidad contra ninfas y/o adultos de *D. citri* se evaluaron sobre adultos de *Hippodamia convergens*, y larvas de *Ceraeochrysa valida* y *Eremochrysa punctinervis* para determinar su efecto sobre estos depredadores utilizados en el control de *D. citri*.

En contraste con *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Zimmermann 2007 a,b) existen pocas investigaciones de los efectos de las diferentes especies de *Isaria* sobre organismos benéficos no- blanco. Goettel *et al* (1990) publicaron una lista de hospederos no blanco para *Isaria farinosa*, sin embargo *I. fumosorosea* no fue enlistada.

Por otro lado, la mayoría de los experimentos sobre los efectos secundarios de *I. fumosorosea* sobre organismos benéficos no-blanco están elaborados en conexión con el uso de este entomopatógeno como agente de control biológico y en general resultó compatible con varios organismos benéficos asociados a las plagas en las que fue evaluado este hongo (Zimmermann, 2008)

El aislado Apopka 97 usado a nivel de invernadero para el control de moscas blancas fue inocuo para insectos benéficos, y pudo ser utilizado en combinación con *Encarsia formosa* (Hymenoptera:Aphelinidae) y *Macrolophus caliginosus* (Hemiptera: Miridae) (Copping, 2004). Adicionalmente, esta cepa también fue encontrada inocua para *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae), *Phytoseiulus persimilis* (Phytoseiidae, Acari) y *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) (Sterk *et al*, 2002). *I. fumosorosea* también es compatible con *Eretmocerus sp.* (Hymenoptera:Aphelinidae), un parasitoide común de *B. tabaci*, y con *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae), un depredador de varias moscas blancas en la región de Florida (Osborne and Landa, 1992). Los estudios sobre las interacciones entre el depredador generalista *Dicyphus hesperus* (Hemiptera: Miridae) e *I. fumosorosea* Apopka-97 revelaron que la densidad de los adultos de *D. hesperus* no era afectada por las múltiples aplicaciones del hongo (Alma *et al.*, 2007).

Sin embargo, *Chrysoperla carnea* y *Chrysoperla sinica* (Neuroptera: Chrysopidae) dos importantes depredadores generalistas fueron enlistados por Smith (1993) como insectos hospederos de *I. fumosorosea*. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo con *Eremochrysa punctinervis* donde se registraron valores de hasta 70 % de mortalidad y de 64.26 % para larvas de primer estadio de *Ceraeochrysa valida*.

En un estudio con ensayos de laboratorio hasta un 22 % de adultos de *Hippodamia convergens* fueron infectados cuando los insectos estuvieron bajo condiciones de estrés (Pell and Vandenberg, 2002). Se observó que los coccinélidos consumieron mas áfidos no infectados en lugar de áfidos infectados, incluso nunca consumieron cadáveres de áfidos con visible crecimiento fúngico.

Los predadores contaminados fueron capaces de transferir conidios a *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Aphididae) sanos. En el presente estudio los ensayos con adultos de *H. convergens* mostraron que las cepas de *I. fumosorosea* evaluadas (Pfr-612 = 8.75 % y Pfr-114 = 6.25 %) registraron los valores mínimos de mortalidad, mostrando la baja susceptibilidad a ser infectados por cepas de *I. fumosorosea*.

Las investigaciones sobre la prevalencia natural de *B. bassiana* han demostrado que este hongo se encuentra ampliamente distribuido en el suelo, así como entre los insectos en el ambiente aéreo. Esto significa que existe una larga y duradera coexistencia evolutiva con otros microorganismos que incluye distintos tipos de interacciones. Desde el punto de vista de seguridad, la principal preocupación es que los microorganismos aplicados en el control biológico puedan potencialmente desplazar a otros organismos no-blanco, ya que después de la aplicación en plantas o suelo, los agentes de biocontrol deben ser capaces de sobrevivir y mantenerse por si mismos

para llevar a cabo la actividad biocontroladora, pero sin interferir con la microbiota residente (Zimmermann, 2007a).

Es bien conocido que *B. bassiana* tiene un amplio rango de hospederos lo cual se traduce en varios cientos de especies de artrópodos; sin embargo, la especificidad del hospedador es realmente una característica específica de una cepa (Zimmermann, 2007a). Por ejemplo, aislados de *B. bassiana* procedentes de *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae) fueron patogénicos hacia adultos de esta especie, pero no hacia adultos de *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) (Cottrell and Shapiro-Ilan, 2003).

Por otro lado, la cepa GHA de *B. bassiana* no fue significativamente patogénica hacia *O. v-nigrum* o *H. axyridis*. En contraste, *B. brongniartii* tiene un rango más estrecho de hospederos en su mayoría restringido a los miembros de la familia de coleópteros Scarabaeidae. En los ensayos realizados en el presente estudio con adultos de *Hippodamia convergens* los aislados de *B. bassiana* causaron los mayores niveles de mortalidad (HIB-2 = 17.5 %, HIB-3 = 21.25 % y HIB-4 = 25 %), lo cual coincide con lo reportado por Berlanga-Padilla y López-Arroyo (2006) quienes reportan mortalidades de 24.4 % por la inoculación de una cepa de *B. bassiana* sobre adultos de *Olla v-nigrum* y de 25.6 % sobre *Harmonia axyridis*.

Generalmente, existe una diferencia entre el rango fisiológico de hospederos y el rango ecológico de hospederos (Hajek and Butler, 2000). El rango fisiológico de hospederos demuestra el rango de especies de insectos que pueden ser infectados en el laboratorio, mientras el rango ecológico de hospederos muestra que insectos pueden ser infectados en la naturaleza o bajo condiciones de campo.

Insectos no-blanco pueden ser infectados bajo condiciones de laboratorio pero no necesariamente puede ser infectado en la naturaleza. Este tema fue ampliamente discutido y detallado por Hajek and Goettel (2000) y Jaronski *et al.*, 2003.

Existen numerosos estudios del efecto de *B. bassiana* sobre organismos benéficos no-blanco, la mayoría de los estudios han sido realizados en laboratorio y pocos bajo condiciones de campo, por ejemplo Donegan and Lighthart (1989) reportaron que la aplicación a nivel laboratorio de *B. bassiana* sobre *Chrysoperla carnea* aunado a condiciones estresantes de temperatura y nutrición afectaron significativamente la susceptibilidad al hongo, siendo el estrés nutricional principalmente, aunado a la presencia del entomopatógeno los factores determinantes para aumentar la mortalidad en larvas y adultos. Respecto a los ensayos con *E. punctinervis* se registraron valores de 90-100 % de mortalidad, mientras que en larvas de primer y segundo estadio de *C. valida* se obtuvieron mortalidades de hasta 71.40 %, estos resultados difieren notablemente con los reportados por Berlanga-Padilla y López-Arroyo (2006) quienes no reportaron mortalidad de larvas de segundo estadio de *C. valida* a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios mL<sup>-1</sup>, sin embargo, Butt *et al.* (1994) y James y Lighthart (1994) indican que la mortalidad depende de la concentración del hongo.

Goettel *et al* (1997, 2001) y Vestergaard *et al* (2003) concluyen que a pesar de la amplia gama de hospederos de *B. bassiana*, la evidencia hasta la fecha sugiere que *B. bassiana* se puede utilizar con un impacto mínimo en organismos no-blanco especialmente cuando se tienen en consideración factores espacio-temporales en la selección de cepas.

Un factor esencial para el éxito de la patogénesis radica en la capacidad de los hongos entomopatógenos para romper el integumento de los insectos por eventos inespecíficos y específicos entre las unidades infectivas (conidios, blastoesporas) y la cutícula del insecto (Jefferies 1997, 1999), entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea* producen múltiples enzimas extracelulares (St. Leger *et al.*, 1993; Ali *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2008; Chul-Kang *et al.*, 1999). La mayoría de los aislados y cepas evaluados en este estudio produjeron un considerable espectro de enzimas proteolíticas, lipolíticas y principalmente quitinolíticas.

*In vivo* la secuencia en la secreción de enzimas corresponde a la composición de polímeros presentes en la cutícula. La desintegración de los componentes de la cutícula es considerada un fenómeno interactivo en el cual los hongos patógenos de insectos podrían haber evolucionado a través de adaptaciones en sus enzimas extracelulares hidrolíticas (St. Leger *et al.*, 1986, 1996 a).

En estudios *in vitro* en placa, la producción de enzimas es típicamente indicada por la formación de zonas claras alrededor de la colonia en crecimiento, estas zonas se denominan halos de inhibición aunque también se puede observar la formación de productos coloreados (Mustafa and Kaur, 2010). La entomopatogénesis implica la participación de proteasas, lipasas y quitinasas (Clarkson and Charnley, 1996). La comprensión actual de los eventos iniciales de la entomopatogénesis por hongos refleja que el sistema enzimático de los hongos entomopatógenos es único y es de gran interés como un posible criterio en la selección y mejora de micoinsecticidas (Mustafa and Kaur, 2010).

En el presente estudio el grado de variabilidad en la secreción de enzimas entre los diferentes aislados y cepas fue significativo. Por ejemplo, la producción de lipasa puede ser influenciada por el tipo y la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno. Estudios previos en la producción de lipasas muestran que los mecanismos que regulan su producción varían ampliamente entre diferentes microorganismos (Sharma *et al.*, 2001).

Por otro lado, diversos estudios mencionan el rol clave que juegan diversos factores en la producción de proteasas extracelulares, principalmente las proteasas Pr1 y Pr2, por ejemplo Bidochka and Khachatourians (1988) reportaron que la presencia de glucosa, glicerol, trehalosa o manitol y amonio combinados en un medio que contenía gelatina reprimió la producción de la serin proteasa Pr1. Esto puede explicar el porqué en algunos de los aislados y cepas evaluadas no se detectó actividad proteasa debido a que el medio utilizado para la detección contenía glucosa que pudo haber actuado como represor.

Por su parte, para las quitinasas se ha considerado que tienen un papel de menor importancia en la patogénesis, especialmente en comparación con la proteasa de *M. anisopliae* (St. Leger *et al.*, 1996 b). La expresión de genes de quitinasas en los microorganismos es controlado por medio de un sistema inductor/represor en el cual la degradación de la quitina o de sus productos actúan como inductores. En levaduras se ha observado que la glucosa y otras fuentes de carbono actúan como represores del sistema (Felse and Panda, 1999).

## 8. CONCLUSIONES

Para la producción de conidios y crecimiento micelial entre los diferentes aislados y cepas no se registró diferencia significativa entre los cinco medios de cultivo evaluados.

La producción promedio de conidios y el crecimiento micelial mostraron alta diferencia significativa entre los aislados y cepas evaluadas, siendo el aislado HIB-4 el que presentó la mayor producción ( $4.85 \times 10^9$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ) mientras que los aislados HIB-2, HIB-3 y HIB-29 presentaron la más baja producción de conidios ( $4.70 \times 10^7$ ,  $1.85 \times 10^7$  y  $1.95 \times 10^7$ ). Respecto al crecimiento micelial la cepa Met presentó el mayor crecimiento (8.06 cm) y el menor se registró para el aislado HIB-18 (3.62 cm).

En los bioensayos con adultos de *D. citri* mediante el método de aspersión directa a la plántula el aislado HIB-19 de *I. fumosorosea* fue el más efectivo en inducir la mortalidad sobre *D. citri* (62.02 %) y para el método de aspersión directa a los insectos los aislados HIB-24 y HIB-32 de *B. bassiana* e *I. fumosorosea*, respectivamente, fueron los más efectivos en inducir la mortalidad sobre *D. citri* (60.66 %).

En el bioensayo por contacto con adultos de *D. citri* los tratamientos evaluados causaron una mortalidad promedio en un rango de 24-100%, con el valor mínimo registrado para la cepa Met de *M. anisopliae* y el máximo para la cepa Pfr-114 de *I. fumosorosea*.

En los bioensayos por aspersión con ninfas de *D. citri* la cepa Pfr-612 de *I. fumosorosea* mostró el mayor porcentaje de mortalidad (84.26 %). Respecto a la capacidad de las cepas para inducir micosis, los resultados indican que la cepa HIB-14 de *B. bassiana* fue la que logró inducir micosis con mayor efectividad sobre las ninfas de *D. citri* (56.78 %).

En el bioensayo con ninfas por sumergido, los valores máximos de mortalidad (100%) fueron causados por los aislados HIB-2, HIB-3, HIB-4 y HIB-5.

Para la actividad proteasa y lipasa por lo menos uno de los aislados es diferente respecto a su índice enzimático. Respecto a la actividad quitinasa existió alta diferencia significativa entre los aislados y cepas evaluadas siendo el aislado HIB-19 el que mostró el mayor índice enzimático (1.50), seguido por el aislado HIB-1 (1.45); mientras que no existió relación entre la mortalidad de ninfas y adultos de *D. citri* y la actividad enzimática.

Para la producción de conidios en grano de arroz (*Oryza sativa* L.) el valor mínimo se registró para el aislado HIB-3 ( $4.80 \times 10^8$  conidios  $g^{-1}$ ) y el máximo para el aislado HIB-4 ( $1.77 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$ ).

En el bioensayo con *H. convergens* el valor mínimo de mortalidad se registró para la cepa Pfr-114 (6.25 %) y el máximo para el aislado HIB-4 (25 %).

En el bioensayo con larvas de tercer estadio de *E. punctinervis* los tratamientos evaluados causaron una mortalidad promedio de 0-10 %, mientras que para pupas el valor mínimo (0 %) se registró para el aislado HIB-5 y el máximo para el aislado HIB-3 (100 %). Respecto a los adultos las mortalidades por causa de los tratamientos fueron de 10 - 50 %, con el mínimo registrado para el aislado HIB-2 y el máximo para la cepa Pfr-114.

En el bioensayo con larvas de primer estadio de *C. valida* los tratamientos evaluados causaron una mortalidad promedio de 14.28 - 35.70 % registrándose el valor mínimo para el aislado HIB-4 y el máximo para el aislado HIB-3, mientras que para pupas el valor mínimo (0 %) se registró para los aislados HIB-2, HIB-4 y la cepa Pfr-114 y el valor máximo (14.28%) para la cepa Pfr-612. Respecto a los adultos las mortalidades por causa de los tratamientos fueron de 14.28 - 49.98 %, con el mínimo registrado para el aislado HIB-3 y la cepa Pfr-612 y el máximo para la cepa Pfr-114.

En el bioensayo con larvas de segundo estadio de *C. valida* los tratamientos evaluados causaron una mortalidad promedio de 0 - 35.70 % registrándose el valor mínimo para el aislado HIB-5 y el máximo para el aislado HIB-3, mientras que para pupas el valor mínimo (0 %) se registró para los aislados HIB-3 y HIB-5. Respecto a los adultos las mortalidades por causa de los tratamientos fueron de 14.28 - 49.98 %, con el mínimo registrado para la cepa Pfr-612 y el máximo para el aislado HIB-2.

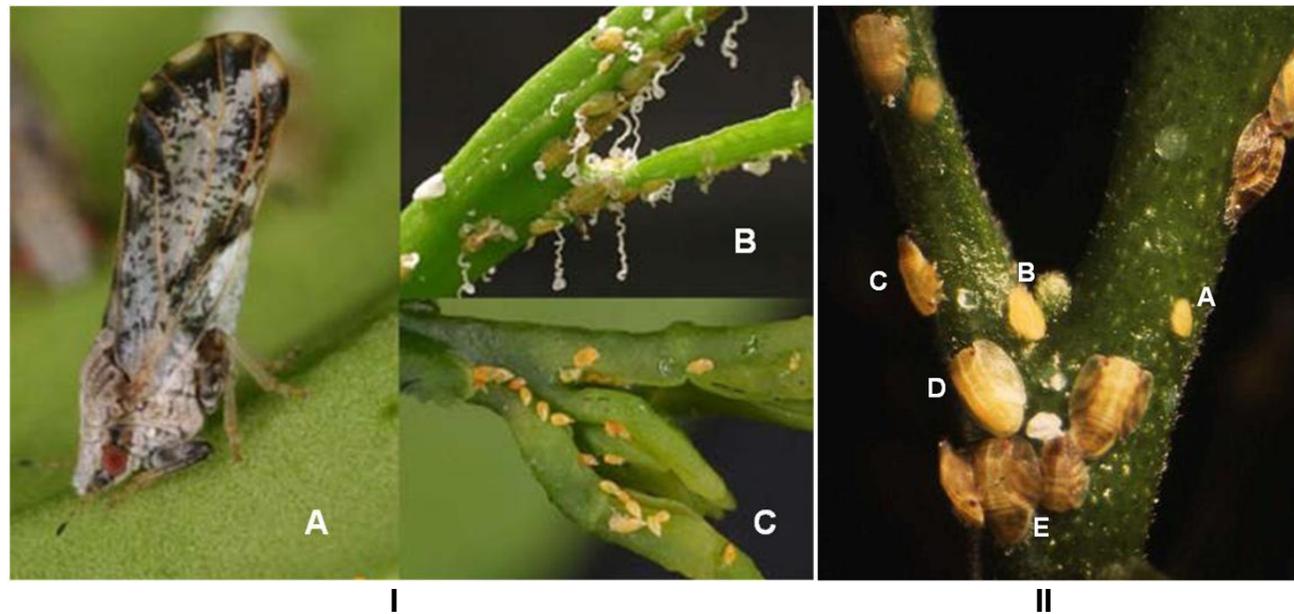
## RECOMENDACIONES

Realizar bioensayos de inocuidad con otros insectos no blanco que atacan a *Diaphorina citri* bajo condiciones de campo y laboratorio.

Realizar bioensayos a nivel de campo con los aislados y/o cepas más promisorias para el control de *D. citri*.

Evaluar otros sustratos sólidos (maíz, trigo, avena, entre otros) para mejorar la producción de conidios.

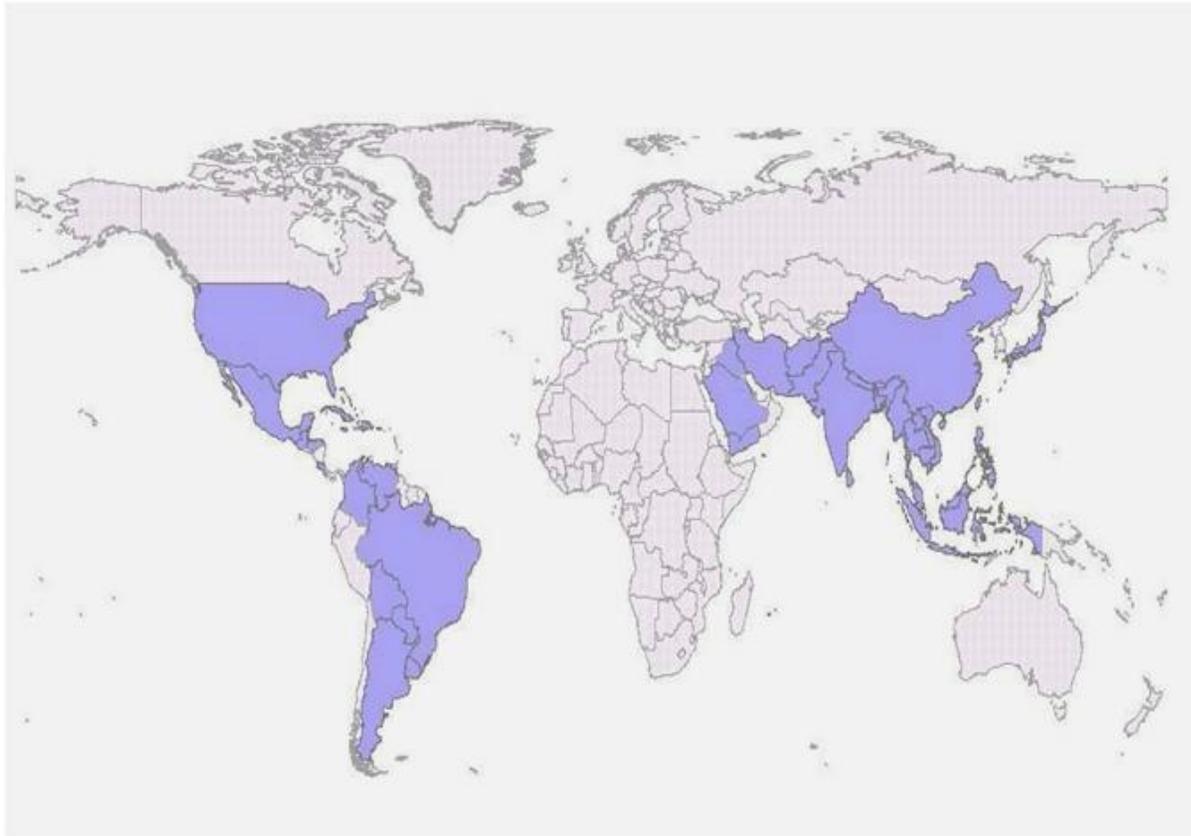
APENDICE A  
BIOLOGIA DE *Diaphorina citri*



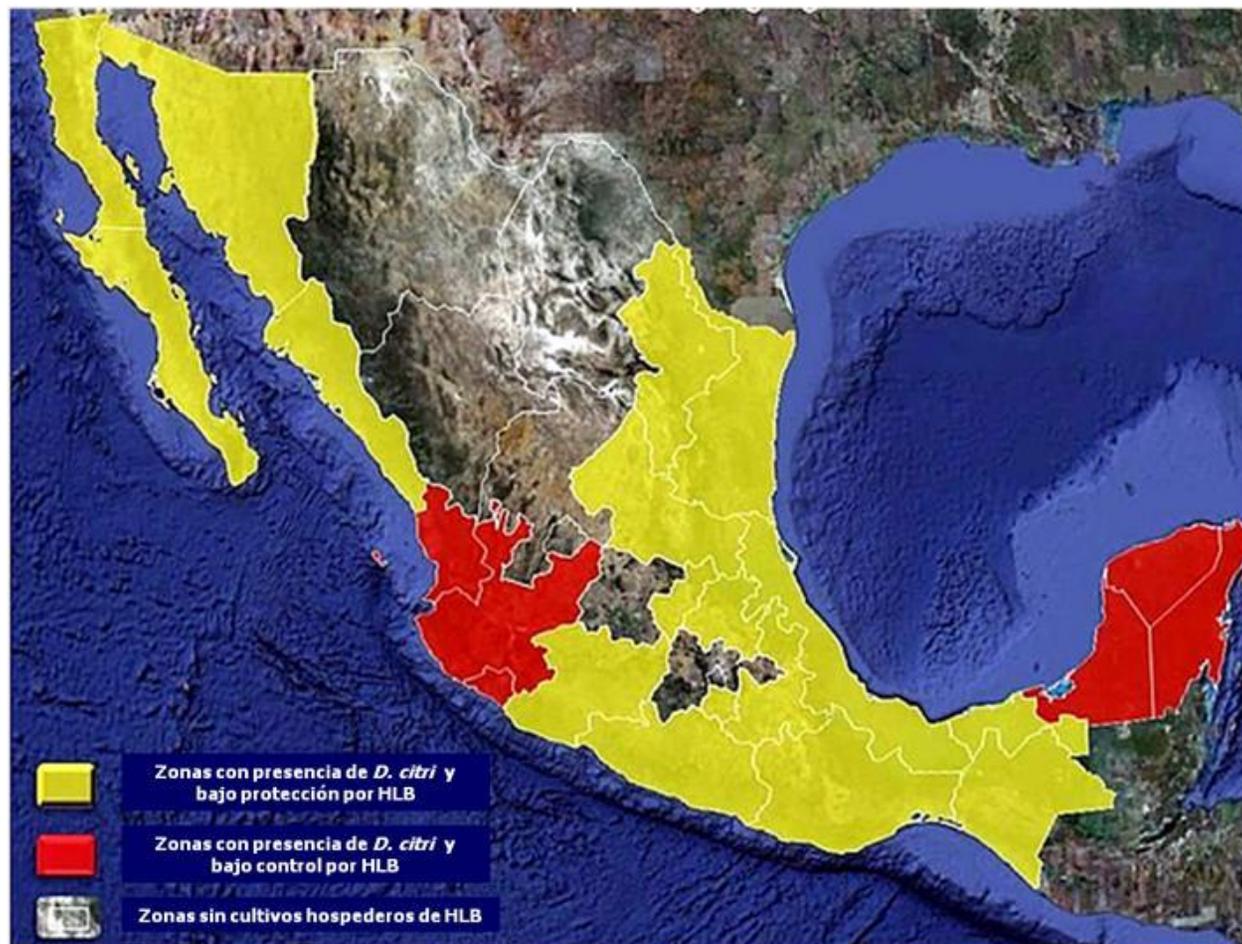
- I. ***Diaphorina citri***. A) Adulto de *Diaphorina citri*, B) estadíos juveniles con túbulos cerosos y C) huevecillos. (Fotos: R.H. Bransky y M.E. Rogers, University of Florida).
- II. **Estadíos ninfales de *Diaphorina citri***. A) 1<sup>o</sup> instar, B) 2<sup>o</sup> instar, C) 3<sup>o</sup> instar, D) 4<sup>o</sup> instar y E) 5<sup>o</sup> instar. (Tomado: <http://ipmworld.umn.edu>).

## APENDICE B

### DISTRIBUCIÓN de *Diaphorina citri*



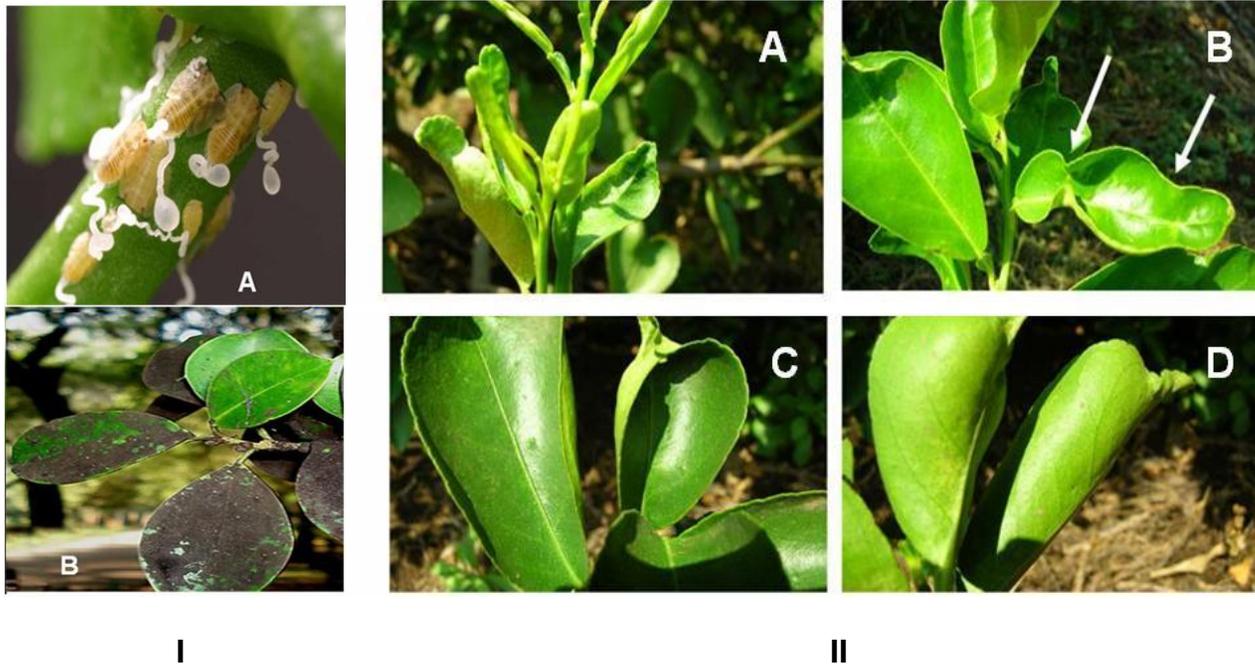
I. Distribución mundial de *Diaphorina citri* (Tomado: SINAVIMO, <http://www.sinavimo.gov.ar>).



II. Distribución y situación fitosanitaria de *Diaphorina citri* y el Huanglongbing en México (Tomado: adaptado de <http://www.senasica.gob.mx>).

## APENDICE C

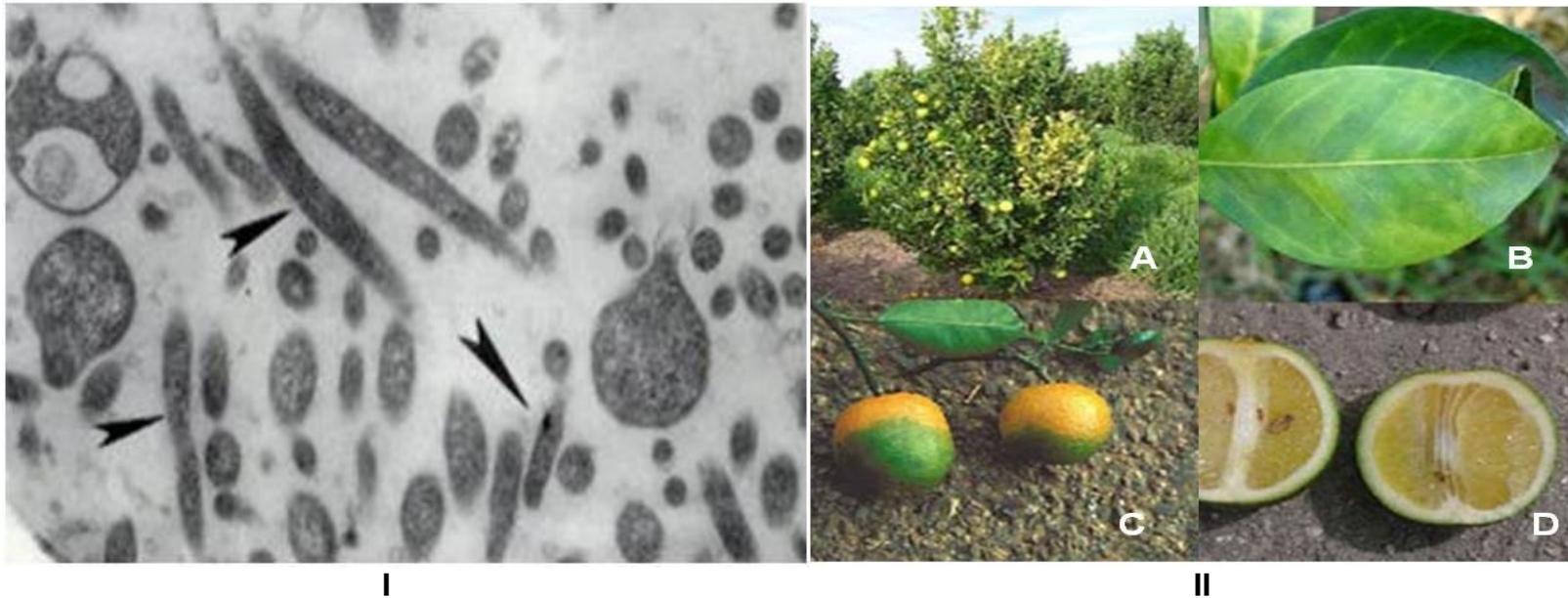
### DAÑO DIRECTO CAUSADO POR *Diaphorina citri*



- I. **Daño directo causado por *Diaphorina citri*.** A) Túbulos cerosos característicos de los estadios juveniles de *D. citri* y B) Aspecto característico de la fumagina en las hojas de cítricos. (Fotos: M. Rogers).
  
- II. **Daño en hoja de limón persa variedad Córcega causado por *Diaphorina citri*** (Tomado: <http://www.frutales.com>).

## APENDICE D

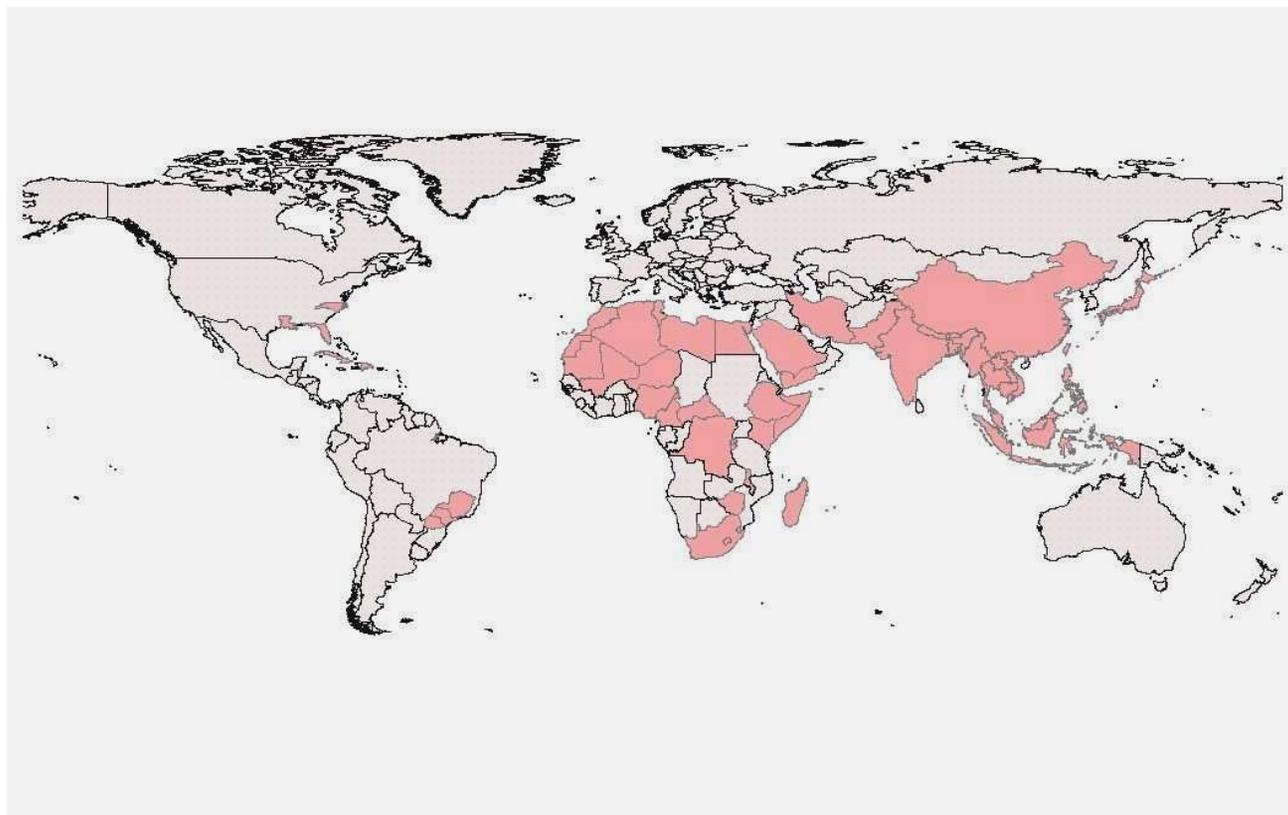
### DAÑO INDIRECTO CAUSADO POR *Diaphorina citri*



I. ***Candidatus Liberibacter asiaticus***, agente causal del Huanglongbing (Foto: M. Garnier).

II. **Huanglongbing (HLB)**. A) Síntomas del HLB, B) Follaje de naranja con el moteado asimétrico del HLB, C) Coloración asimétricas de frutos y D) Engrosamiento y deformación de la columna media. (Fotos: UC Statewide IPM Program).

**APENDICE E**  
**DISTRIBUCION MUNDIAL DEL HUANGLONGBING**



- I. **Distribución mundial del HLB** (Tomado: SINAVIMO, <http://www.sinavimo.gov.ar>).

## APENDICE F

**Insecticidas y otros productos de origen químico seleccionados por causar alta mortalidad de *Diaphorina citri*. Experimentos regionales en la citricultura de México en el año 2010\*.**

| Grupo Químico      | Modo de acción                                 | Ingrediente activo   | Nombre Comercial   |
|--------------------|--|--|--|
| OC-Ciclodienos     | Antagonista de los canales de cloro neuronales | endosulfán   | Endosulfán   |
| Organofosforado    | Inhibidor de la acetilcolinesterasa            | clorpirifos  | Clorpirifos  |
| OP-Cx              |  | dimetoato<br>metamidofos<br>monocrotofos<br>ometoato<br>acefato<br>fosmet<br>malathion | Dimetoato<br>Metamidofos<br>Monocrotofos<br>Ometoato<br>Orthene<br>Imidan<br>Malathion 1000* |
| Piretroide tipo II | Modulador de los canales de sodio              | bifentrina   | Bifentrina   |
|                    |  | Bifentrina+abamectina  | Talstar Xtra   |
|                    |  | fenpropatrin   | Herald   |
| Neonicotenoide     | Agonista de los receptores de acetilcolina     | imidacloprid   | Confidor   |

|                                |   |   |   |
|--------------------------------|---|---|---|
|                                |   | imidacloprid<br>imidacloprid  | Imidacloprid<br>Imidacloprid (suelo-<br>cuello)     |
|                                |   | thiametoxam<br>dinotefuran<br>thiacloprid   | Actara<br>Venom<br>Thiacloprid                      |
| Neonicotenoide +<br>piretroide | Agonista de los<br>receptores de acetilcolina<br>y modulador de<br>los canales de sodio | imidacloprid + beta<br>ciflutrina   | Muralla Max   |
|                                |   | imidacloprid +<br>ciflutrina<br>thiametoxam +<br>lambdacihalotrina<br>spirotetramat | Leverage<br>Engeo<br>Movento                        |
| Acido tetrámico o<br>tetrónico | Inhibidor de la<br>acetilcoenzima A<br>carboxilasa                                      |   |   |
| Spinosines<br>Aceite           | -<br>Hipoxia  | spinetoram<br>aceite mineral<br>aceite mineral<br>geraniol                          | Palgus<br>Citrolina 1%<br>Pure Spray 1%<br>Bemistop |
| Botánico                       | -   | azadiractina (neem)<br>tricarboxilos  | Nimicide<br>BioDie                                  |

|                                  |   |   |                                     |
|----------------------------------|---|---|-------------------------------------|
| Mímico de la hormona juvenil     | Inhibidor de la alimentación/ Regulador del crecimiento             | pyriproxifen                                      | Knack                               |
| METI<br>acaricidas/insecticidas  | Inhibidor del transporte de electrones de la mitocondria complejo i | fenazaquin  | Magister                            |
| Sales potásicas de ácidos grasos | Rompimiento de ácidos grasos cuticulares                            | sales de potasio                                  | Impide                              |
| Detergente                       |   | ácidos grasos de especies vegetales<br>Detergente | Agro Soap<br>Ariel<br>Roma<br>Salvo |
| Triazapentadienos<br>Mineral     |   | amitraz<br>óxido de cal                           | Mitac<br>Cal hidratada              |

---

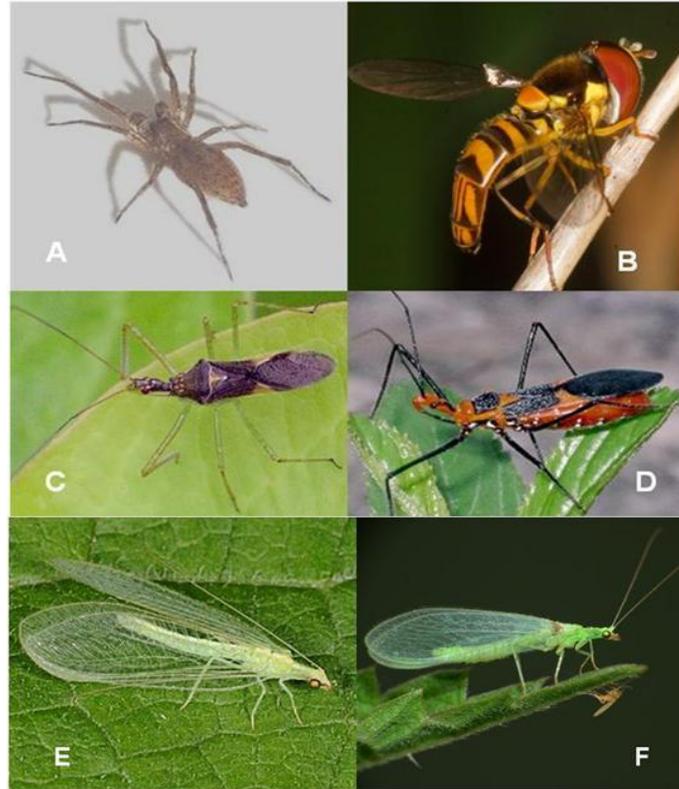
\* Adaptado de López-Arroyo *et al* (2010)

APENDICE G  
DEPREDADORES DE *Diaphorina citri*



I

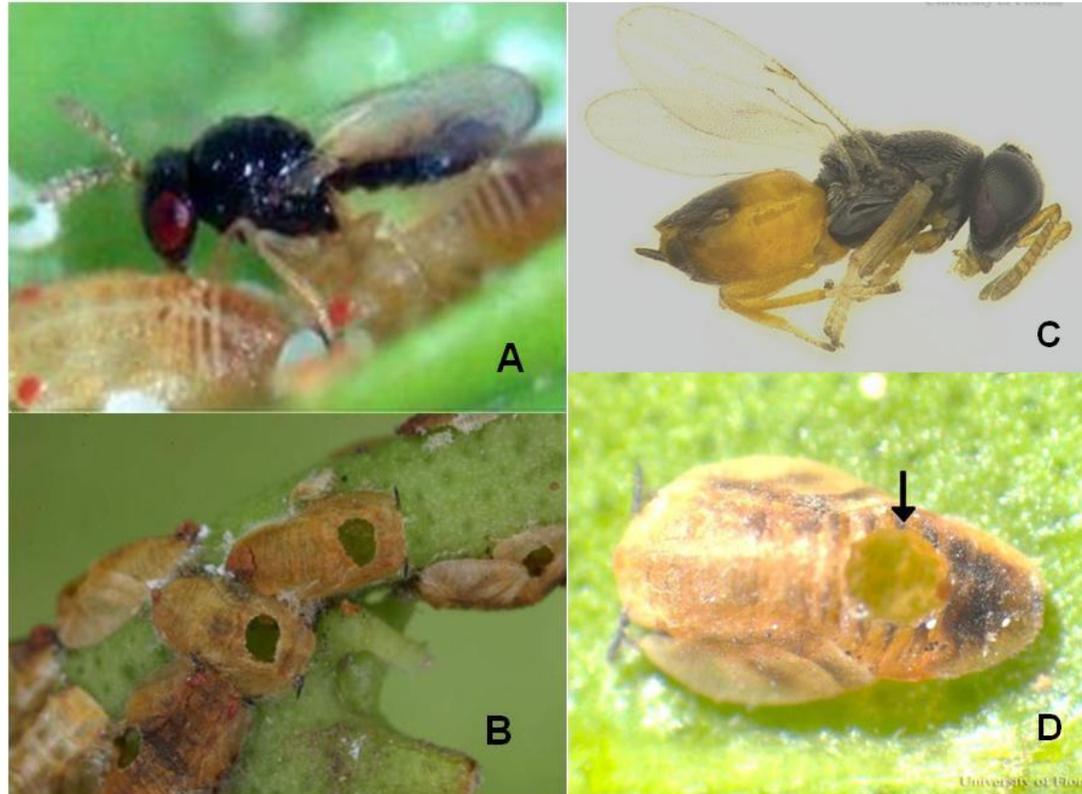
- I. **Coccinélidos depredadores de *Diaphorina citri*.** A) *Harmonia axyridis*, B) *Olla v-nigrum*, C) *Curinus coeruleus*, D) *Cheilomenes sexmaculata*, E) *Cycloneda sanguínea* y F) *Coccinella septempunctata* (Tomado: <http://www.discoverlife.org>).



## II

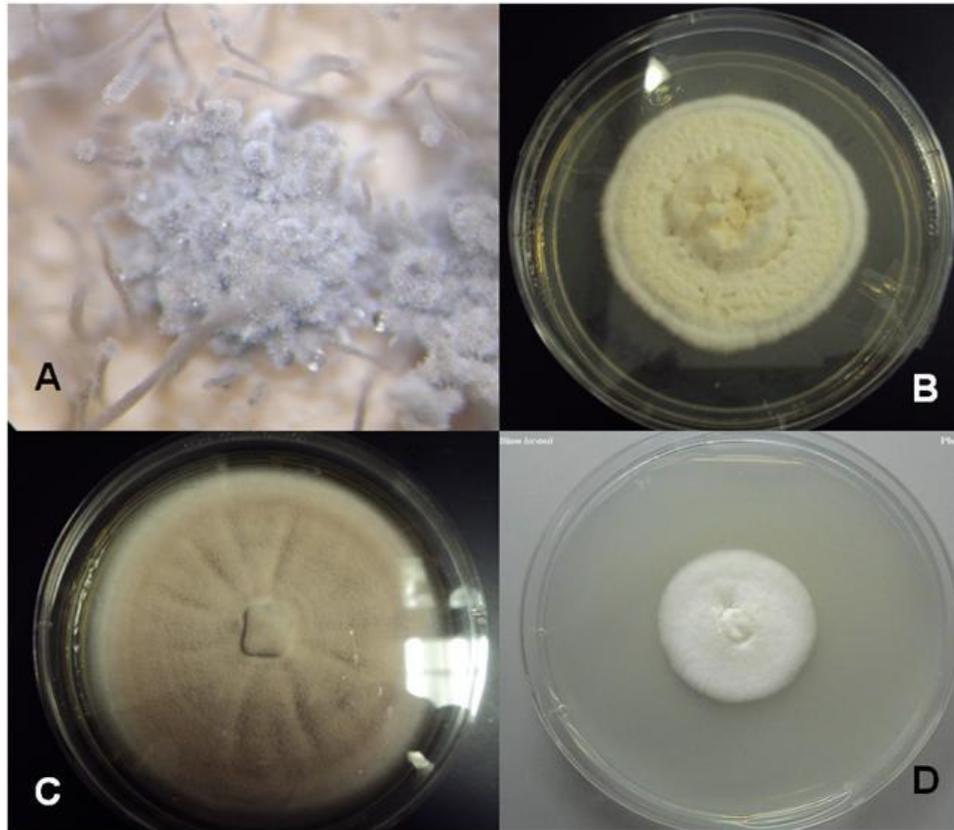
**II. Depredadores que atacan a *Diaphorina citri*.** A) *Hibana velox* (= *Aysha velox*) (Arachnida: Anyphaenidae), B) *Allograpta obliqua* (Diptera: Syrphidae), C) *Zelus renardii* (Hemiptera: Reduviidae), D) *Zelus longipes* (Hemiptera: Reduviidae) (Tomado: <http://www.austinbug.com/reduviidae.html>), E) *Chrysoperla rufilabris* y F) *Chrysoperla carnea* (Tomado: <http://www.portalflorystyczny.pl>).

APENDICE H  
PARASITOIDES DE *Diaphorina citri*



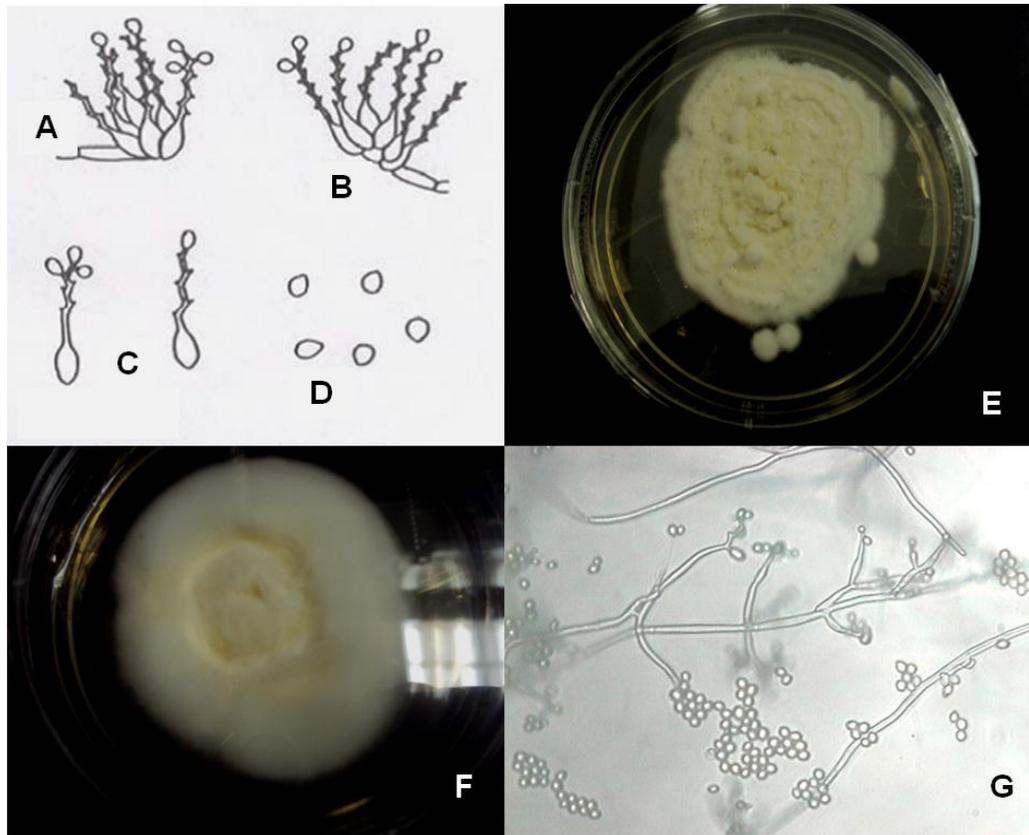
- I. **Parasitoides de *Diaphorina citri*.** A) *Tamarixia radiata*, B) hoyos de emergencia de adultos de *T. radiata* a partir de ninfas momificadas de *D. citri* (Tomado: <http://www.forestryimages.org>), C) *Diaphorencyrtus aligarhensis* y D) Ninfa de *D. citri* momificada con un hoyo de emergencia en la región abdominal característico de *D. aligarhensis* (Tomado: <http://entnemdept.ufl.edu>).

**APENDICE I**  
**HONGOS ENTOMOPATOGENOS QUE INFECTAN A *Diaphorina citri***



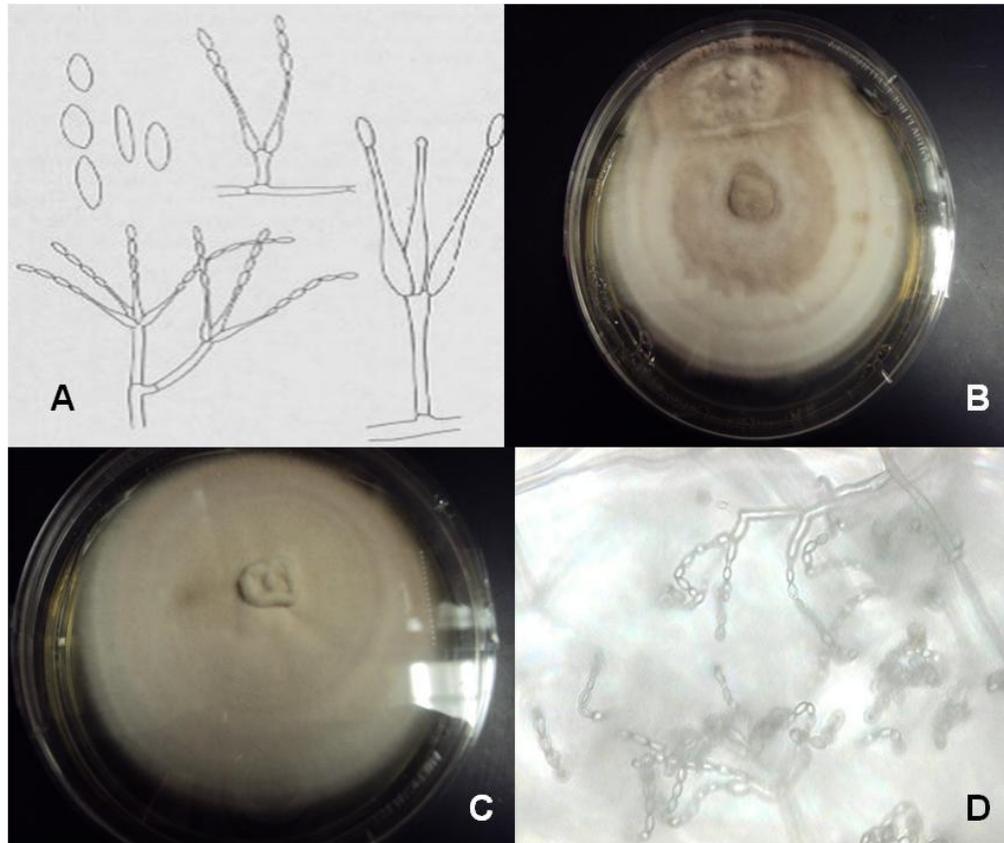
**I. Hongos entomopatógenos que infectan a *Diaphorina citri*.** A) *Hirsutella citriformis*, B) *Beuaveria bassiana*, C) *Isaria fumosorosea*. (Fotos: R. Rodríguez-Guerra, F.L. Gandarilla-Pacheco) y D) *Verticillium lecanii* (Tomado:<http://www.naro.affrc.go.jp>).

APENDICE J  
MORFOLOGIA DE *Beauveria bassiana*



- I. ***Beauveria bassiana***. A y B) grupos de conidióforos de *B. bassiana* mostrando su arreglo típico, C) conidióforo con esporas en la parte superior, D) conidios (tomado de H. L. Barnett y B. Hunter, 1998), E y F) morfología colonial de *B. bassiana* y G) Microcultivo de *B. bassiana* observado a 100 x (Fotos: F.L. Gandarilla-Pacheco).

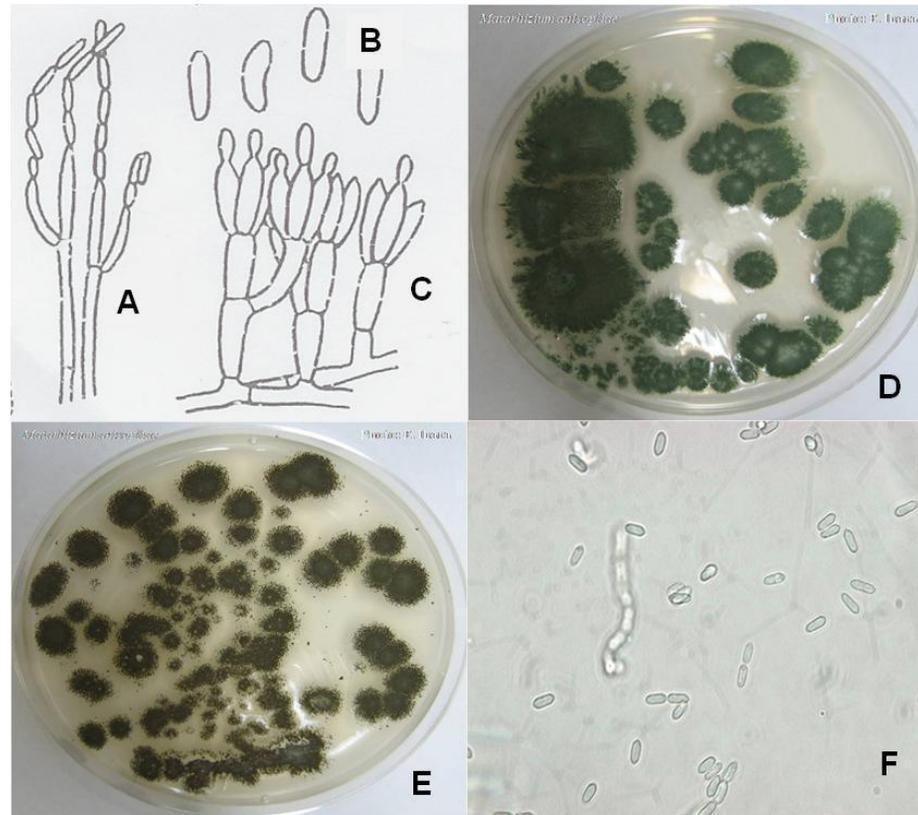
**APENDICE K**  
**MORFOLOGIA DE *Isaria fumosorosea***



- I. ***Isaria fumosorosea***. A) Esquema de *I. fumosorosea* que muestra su típico arreglo de conidios en cadena (Tomado: H. L. Barnett y B. Hunter, 1998), B y C) Morfología colonial de *I. fumosorosea* y D) Microcultivo de *I. fumosorosea* observado a 100 x (Fotos: F.L. Gandarilla-Pacheco).

## APENDICE L

### MORFOLOGIA DE *Metarhizium anisopliae*



- I. ***Metarhizium anisopliae***. Esquema de *M. anisopliae* que muestra su morfología típica. A y C) conidióforos y B) conidios. (Tomado: H. L. Barnett y B. Hunter, 1998), D y E) morfología colonial de *M. anisopliae* (Tomado: <http://www.naro.affrc.go.jp>) y F) conidios de *M. anisopliae* observados a 100 x (Foto: F.L. Gandarilla-Pacheco).

## LITERATURA CITADA

Alean-Carreño I. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá, D.C. Colombia. Trabajo de grado. pp.33-52.

Ali S, Huang Z, Xiang Ren S. 2009. Production and extraction of extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Isaria fumosoroseus* (Cordycipitaceae: Hypocreales). *Biocontrol Sci. and Technol.* 19(1):81-89.

Alemán J, Baños H, Ravelo J. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad huanglongbing: una combinación destructiva para la producción citrícola. *Rev. Protección Veg.* 22 (3): 154-165.

Alma CR, Goettel MS, Roitberg BD, Gillespie DR. 2007. Combined Effects of the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* Apopka-97, and the generalist predator, *Dicyphus hesperus*, on whitefly populations. *BioControl* 52: 669-681.

Alves, S. 1998. Fungos entomopatogénicos, pp. 289-381. In: S. B. Alves (ed.), *Controle Microbiano de Insetos*. 2nd ed. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ). Piracicaba, San Paulo, Brazil, pp.1163

Aubert B. 1987. *Trioza erytrae* 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.

Avery PB, Hunter WB, Hall DG, Jackson MA, Powell A, Rogers M. 2009. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) infection and dissemination of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) under laboratory conditions. *Florida Entomologist* 92(4):608-618.

Barnes SE, Moore D. 1997. The effect of fatty, organic or phenolic acids on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Mycol. Res.* 101: 662-666.

Berlanga-Padilla AM, López-Arroyo JI. 2006. Efecto de hongos entomopatógenos en depredadores del pulgón café de los cítricos (Homóptera: Aphididae) pp. 384-388. In: *Memorias del XXIX Congreso Nacional de Control Biológico*. Manzanillo, Colima, México.

Bischoff JF, Rehner SA, Humber RA. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101(4): 512–530.

Bidochka MJ, Khachatourians GG.1988. Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Exp. Mycol. 12:161-168.

Bidochka M, Low N, Khachatourians G. 1990. Carbohydrate storage in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Appl. Environ. Microbiol 56: 3186-3190.

Bidochka, MJ, St. Leger, RJ, and Roberts DW. 1997. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. Memoirs of the Entomological Society of Canada. 171: 213-224.

Blâchere H, Calvez J, Ferron P, Corrieu G, Peringer P. 1973. Etude de la formulation et de la conservation d'une préparation entomopathogène a base de blastospores de *Beauveria tenella*. Ann. Zool.Ecol.anim. 5(1): 69-79.

Butt TM, Ibrahim L, Ball BV, Clark SJ. 1994. Pathogenicity of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. Biocontrol Sci. Technol. 4 : 207-214

Bustillo A. 2001. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de entomología. Bogotá. pp. 30-53

Carneiro R, Kulcznski S. 1993. Metodología de la producción de conidios para diferentes aislados de *Paecilomyces sp.* em arroz. Nematologia Brasileira. 17 (1): 98-101.

Carrera J. 2003. Production and application of industrial enzymes. Revista Facultad de Ciencias Agropecuarias (1)1: 10-15.

Cattling HD. 1970. Distribution of the psyllid vectors of citrus greening disease, with notes on the biology and bionomics of *Diaphorina citri*. FAO Plant Protection Bulletin 18: 8-15.

Cermeli M, Morales P, Godoy F. 2000. Presencia del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en Venezuela. Boletín Entomología Venezolana 15: 235-243.

Ciba-Geigy SW. 1981. Manual para ensayos de campo en protección vegetal. Suiza, Wener Puntener. pp.597

Clarkson JM, Charnley AK.1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. Trends Microbiol.4:197-204.

Copping LG. 2004. The Manual of Biocontrol Agents. British Crop Protection. Alton, UK pp. 105-106.

Coronado BJ, Ruíz CE. 2004. Registro del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) para México. Folia Entomol. Mex. 43(1):165-166.

Cortez-Mondaca E, López-Arroyo JI, Rodríguez-Ruíz L, Partida-Valenzuela MP, Pérez-Márquez J, González-Calderón VM. 2011. Capacidad de depredación de especies de Chrysopidae asociadas a *Diaphorina citri* Kuwayama en los cítricos de Sinaloa, México pp.323-333. En: López Arroyo JI, González Lauck VW (Comp). Memoria 2<sup>do</sup> Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México, Montecillo, Edo. de México, México. Centro Regional de Investigación del Noreste (CIRNE), Campo Experimental General Terán.CD-ROM.

Cotes-Prado AM. 1997. Producción masiva y formulación de microorganismos biocontroladores de fitopatógenos. En: Memorias del Seminario Internacional de Control biológico de fitopatógenos. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Santafé de Bogotá, Colombia. pp: 18 – 23.

Cottrell TE, Shapiro-Ilan DI. 2003. Susceptibility of native and an exotic lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) to *Beauveria bassiana* . Journal of Invertebrate Pathology 84:137-144.

Champlin FR, Cheung PYK, Pekrul S, Smith RJ, Buton RL, Gula EA. 1981. Virulence of *Beauveria bassiana* mutants for the pecan weevil. Journal of Economic Entomology. 74: 617-621.

Charnley A. 1984. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review. In: Invertebrate microbial interactions. Anderson J, Rayner A, Walton D. Cambridge University Press. Cambridge. pp 229-270.

Chien CC. 1995. The role of parasitoids in the pest management of citrus psyllid. In: Proceedings of the Symposium on Research and Development of Citrus in Taiwan, Taichung, Taiwan, pp. 245-261.

Chien CC, Chu YI. 1996. Biological control of citrus psyllid, *Diaphorina citri* in Taiwan. Inter. J. Pest Mgt. 34: 93-105.

Chul-Kang S, Park S, Gyu Lee D .1999. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology 73:276–281.

da Graça JV. 1991. Citrus greening disease. Annu. Rev. Phytopathology 29: 109-136.

Dalla SHS, Dalla SOR, Brand D, De Souza VLP, Soccol CR. 2005. Spore production of *Beauveria bassiana* from agroindustrial residues. Brazilian archives of Biology and Technology an International Journal. 48: 51.

Derakhshan A, Rabindra RJ, Ramanujam B, Rahimi M. 2008. Evaluation of different media and methods of cultivation on the production and viability of entomopathogenicfungi *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. Pakistan Journal of Biological Sciences. 11 (11):1506-1509.

Deshpande MV .1999. Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. Crit. Rev. Microbiol. 25: 229-243.

Dias BA, Neves PMOJ, Furlaneto-Maia L, Furlaneto MC. 2008. Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. Brazilian Journal of Microbiology 39:301-306.

Donegan K, Lighthart B. 1989. Effect of several stress factors on the susceptibility of the predatory insect, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae), to the fungal pathogen *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology 54:79-84.

European and Mediterranean Plant Protection Organization/Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP/EPPO) .2005. EPPO Standards PM 7/52. Diagnostic protocol for *Diaphorina citri*. OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, pp: 331–333.

España-Luna MP. 2000. Caracterización enzimática de aislados de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), y su virulencia sobre *Epilachna varivestis* (Coleóptera: Coccinellidae). Tesis (Maestría). Universidad de Colima.

Étienne J, Burckhardt D, Grapin C. 1998. *Diaphorina citri* (Kuwayama) en Guadeloupe, premier signalement pour les Caraïbes (Hem., Psyllidae). Bulletin de la Société Entomologique de France 103:32.

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

Fernández M, Miranda I. 2005. Comportamiento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae) Parte I: características morfológicas, incidencia y enemigos naturales asociados. Rev. Protección Veg. 20 (1): 27-31.

French JV, Kahlke CJ, Da Graça JV. 2001. First record of the Asian citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) in Texas. *Subtropical Plant Science*. 53: 14-15.

Ferron P. 1981. Pest Control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: Burges H (ed). *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. p.465-482. Academic Press, New York.

Ferron P. 1978. Biological control of insect pest by entomopathogenous fungi. In: *Annual review of entomology* 23: 409-442.

Fargues J, Smits N, Vidal C, Vey A, Veja F, Mercadier G, Quimby P. 2002. Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologia* 154(3): 127-138.

Fernández C, Juncosa R. 2002. Biopesticidas: ¿La Agricultura del Futuro? *Phytoma*.141:14-19.

Felse PA, Panda T. 1999. Regulation and cloning of microbial chitinases genes. *Appl. Microbial Biotechnology* 51:141-151.

Feng MT, Poprawski G, Khachatourians G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Sci. and Technol.* 4:3-34.

Figuroa LM, Varela A, Corredor D. 2007. Evaluación de sustratos naturales para la propagación masiva del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromicotina:Hyphomycetes). *Revista de Investigación, Universidad La Salle Bogotá, Colombia* 7(1):127-131.

Gao L, Liu X. 2010. Nutritional requirements of mycelial growth and sporulation of several biocontrol fungi in submerged and on solid culture. *Microbiol.* 79(5):612–619.

Gillespie A. 1988. Use of fungi to control pest of agricultural importance. In: Burge M (Ed). *Fungi in biological control systems*. Manchester University Press, Manchester, England. pp.269

Gillespie AT, Claydon N. 1989. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Sci.* 27: 203-215.

Goettle MS, Roberts DW. 1992. Mass production, formulation and field application of entomopathogenic fungi. In: Lomer CJ, Prior C (Eds). *Biological control of locusts and grasshoppers*. CABI International, Wallingford, U.K.pp:230-238.

Goettel MS, Inglis GD. 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey L.A. (Ed). Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, Inc., San Diego, pp. 213–249.

Goettel MS, Hajek AE, Siegel JP, Evans HC. 2001. Safety of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson C, Magan N, editors. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. Wallingford: CAB International. pp. 347-376.

Griffin DH. 1981. Fungal physiology. A while-Interscience publication, USA. New York. pp. 102-127, 260-279.

Griffin DH. 1996. Fungal physiology. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, USA. pp.102-127, 260-279.

Guadix A, Guadix E, Páez-Dueñas M, González-Tello P, Camacho F. 2000. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Arspharmaceutica* (41)1: 79-89.

Gupta SC, Leathers TD, El-Sayed GN, Ignoffo CM. 1994. Relationship among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology* 64:13-17.

Hajek AE, St. Leger RJ. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annual Review of Entomology*, 39 293 - 322.

Hajek AE, Goettel MS. 2000. Guidelines for evaluating effects of entomopathogens on nontarget organisms. In: Lacey LA, Kaya HK (eds). Manual of field techniques in insect pathology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp 847-868.

Halbert SE, Manjunath KL. 2004. Asian citrus psyllid (Sternorrhyncha: Psyllidae) and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87(3): 330-349.

Halbert SE, Nunez CA. 2004. Distribution of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Sternorrhyncha: Psyllidae) in the Caribbean basin. *Florida Entomologist* 87:401-402.

Halbert SE, Niblett CL, Manjunath KL, Lee RF, Brown LG. 2002. Establishment of two new vectors of citrus pathogens in Florida. *Proc. International Soc. Citriculture IX Congress*, ASHS Press, Alexandria, VA. pp. 1016-1017.

Hall DG. 2008. Biological Control of *Diaphorina citri*. En: Resúmenes del I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus*

Liberibacter spp.) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). Servicio Nacional De Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-SAGARPA y Organización Norteamericana de Protección a las Plantas. Mayo 2008, Hermosillo, Son. Méx.

Hall DG, Hentz MG, Meyer JM, Kriss AB, Gottwald TR, Boucias DG. 2012. Observations on the entomopathogenic fungus *Hirsutella citriformis* attacking adult *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in a managed citrus grove. *BioControl* 57(5):663-675.

Hegedus D, Bidochka M, Khachatourians G. 1990. *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 641-647.

Hegedus DD, Khachatourians GG. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agentes. *Review Biotechnology Advances* 13(3): 455-490.

Hollis D. 1987. A new citrus-feeding psyllid from the Comoro Islands, with a review of the *Diaphorina amoena* species group (Homoptera). *Systematic Entomology* 12:47–61.

Hoy MA, Singh R, Rogers M. 2010. Evaluation of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist* 93(1): 24-32.

Huang CH, Tsai MY, Wang CL. 1984. Transmission of citrus likubin by a psyllid, *Diaphorina citri*. *J. Agric. Res. China.* 33(1): 15-72.

Humber RA, Hansen K.S. 2005. USDA-ARS Collection of entomopathogenic fungal cultures (ARSEF), ARSEF-Catalog: Host by Fungus. <http://arsef.fpsnl.cornell.edu>.

Hunter DM, Milner RJ, Spurgin PA. 2001. Aerial treatment of the Australian plague locust, *Chortiocetes terminifera* (Orthoptera: Acrididae), with *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in Australia. *Bull. Entomol. Res.* 91:93-99.

Husain MA, Nath LD. 1927. The citrus psylla (*Diaphorina citri* Kuw.) (Psyllidae: Homoptera). *Memoirs of the Department of Agriculture in India, Entomological Series* 10(2):1–27.

Inglis PW, Tigano MS. 2006. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) Isolates Using rDNA-ITS Sequences, *Genetics and Molecular Biology* 29: 132-136.

Jackson MA, Payne AR. 2007. Evaluation of the desiccation tolerance of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) using a lab-scale, air-drying chamber with controlled relative humidity. *Biocontrol Sci. and Technol.* 17(7):709 - 719

James RR, Lighthart B. 1994. Susceptibility of the convergent lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) to four entomogenous fungi. *Environ. Entomol.* 23(1):190-192

Jaronski ST, Goettel MS, Lomer CJ. 2003. Regulatory requirements for ecotoxicological assessments of microbial insecticides how relevant are they? pp. 237-260. In: Hokkanen HMT and Hajek AE (eds.). *Environmental impacts of microbial insecticides*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

James R. 2001. Effects of exogenous nutrients on conidial germination and virulence against the Silverleaf Whitefly for two hyphomycetes. *J. Invertebrate Pathol.* 77:99-107.

Jasso-Argumedo J, Lozano-Contreras M, Barroso-Aké H, López-Arroyo JI. 2010. Abundancia estacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae) y sus enemigos naturales en huertas de limón persa en Yucatán, México. pp:311-318. En: López-Arroyo JI, González-Lauck VW. (Comp.). *Memoria:1er Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México, Monterrey, N.L., México del 8 y 9 de diciembre, 2010*. Centro Regional de Investigación del Noreste (CIRNE), Campo Experimental General Terán. CD-ROM. Memoria Científica. ISBN en trámite.

Jeffs LB, Xavier IJ, Matai RE, Khachatourians GG. 1997. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Verticillium*. *Can. J. Microbiol.* 45: 936-948.

Jeffs LB, Xavier IJ, Mathai R, Khachatourians GG. 1999. Relationships between fungal spore morphologies and surface property of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* and *Verticillium*. *Can. J. Microbiol.* 45:936-948.

Jenkins N, Heviefó G, Jürgen L. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News Inf.* 19(1): 21-31.

Khachatourians GG. 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In: Howard DH, Miller JD (Eds). *The Mycota VI. Human and animal relationship*. Springer. Berlin, Alemania. pp. 331-364.

Khachatourians GG. 1991. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In: Arora DK, Ajello L, Mukerji KG (Eds). Handbook of Applied Mycology Vol. 2: Humans, animals and insects. Dekker, Nueva York, EE.UU. pp. 613-661.

Lacey LA, Frutos R, Kaya HK, Vail P. 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? Biol. Control 21:230-248.

Leathers TD, Gupta SC. 1993. Susceptibility of the eastern tent caterpillar (*Malacosoma americanum*) to the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology, 61: 217-219.

Lezama-Gutiérrez R, Molina-Ochoa J, Chávez-Flores O, Ángel-Sahagún CA, Skoda SR, Reyes-Martínez G, Barba-Reynoso M, Rebolledo-Domínguez O, Ruíz-Aguilar GML, Foster JE. 2012. Use of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* and *Isaria fumosorosea* to control *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Persian lime under field conditions. International Journal of Tropical Insect Science 32 (1):39-44.

Li DP, Holdom DG .1995. Effects of nutrients on colony Formation, growth, and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). J. Invert. Pathol. 65(3):253-260.

Li ZZ. 1988. List on the insect hosts of *Beauveria bassiana* . In: Study and application of entomogenous fungi in China, Vol. 1. Beijing: Academic Periodical Press. pp 241-255.

Liu YH, Tsai H. 2000. Effect of the temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). Ann. Appl. Biol. 137: 201-216.

Liu XZ, Chen SY .2002. Nutritional requirement of the nematophagous fungus *Hirsutiella rhossiliensis*. Biocontrol Sci. Technol. 12:381-393.

Lecuona R, Loc CJ, Riba G, Joulie C, Juárez P. 1997. Spore germination and hyphal growth of *Beauveria* sp. on insect lipids. Journal of Economic Entomology 90(1): 119-123.

Lomer CJ, Bateman RP, Johnson DL, Langewald J, Thomas M. 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. Ann. Rev. Entomol. 46:667–702.

López-Arroyo JI, Loera Gallardo J, Miranda Salcedo MA, Reyes Rosas MA, Rocha Peña MA. 2004. Manejo integrado de plagas de cítricos. In: Memorias del Simposio Internacional Manejo Fitosanitario del Cultivo de los Cítricos. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Julio de 2004. Veracruz, Ver.

López-Arroyo JI, Jasso J, Reyes MA, Loera-Gallardo J, Cortez-Mondaca E, Miranda MA. 2009. Perspectives for biological control of *Diaphorina citri*

(Hemiptera: Psyllidae) in Mexico, pp. 329-330. In: Gottwald TR, Graham JH. Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing. Dec. 1-5, 2008. Orlando, Florida.

López-Arroyo JI, Díaz-Zorrilla U, Hernández-Fuentes LM, Cortez-Mondaca E, Robles-González MM, Villanueva-Jiménez JA, Cabrera-Mireles H, Loera-Gallardo J, Fú-Castillo A, Varela-Fuentes S, Jasso-Argumedo J, Curti-Díaz S. 2010. Control químico del psílido asiático de los cítricos en México: selección de insecticidas y épocas de aplicación. pp. 449-461. En: López-Arroyo JI, González-Lauck VW (Comp). Memoria: 1er Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México, Monterrey, N.L., México del 8 y 9 de diciembre, 2010. Centro Regional de Investigación del Noreste (CIRNE), Campo Experimental General Terán. CD-ROM. Memoria Científica. ISBN en trámite.

Luangsa-ard JJ, Hywel-Jones NL, Manoch L, Samson RA. 2005. On the Relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycological Research* 109: 581-589.

Mata-Villegas T. 2008. Evaluación de matrices de esporulación y formulación de un bioinsecticida a base de esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Tesis (Maestría), Instituto Politécnico Nacional. Tlaxcala, México.

McFarland CD, Hoy MA. 2001. Survival of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) and its two parasitoids, *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) and *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae), under different relative humidities and temperature regimes. *Fla. Entomol.* 84: 227-233.

Mellín-Rosas MA, Sánchez-González JA, Fabela-Rojas G, Cruz-Ávalos AM, Arredondo-Bernal HC. 2009. Selección de cepas de hongos entomopatógenos como agentes de control microbiano de ninfas y adultos de *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae), pp. 410-415. En: Zapata-Mata R, Contreras-Sánchez WM, Granados-Berber AA, Arriaga- Weiss SL (Eds). Memoria XXXII Congreso Nacional de Control Biológico. Villahermosa, Tabasco, México. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Mellín-Rosas MA, Hernández-Betancourt I, Núñez-Camargo M, Arredondo-Bernal HC. 2011. Efectividad de hongos entomopatógenos en el control del psílido de los cítricos *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) en Colima, pp: 367-372. En: López Arroyo JI, González-Lauck VW. (Comp). Memoria 2<sup>do</sup> Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México, Montecillo, Edo. de México, México. Centro Regional de Investigación del Noreste (CIRNE), Campo Experimental General Terán. CD-ROM.

Méndez A, del Pozo E, García I. 2009. Producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson mediante una alternativa de cultivo bifásico. Rev. Protección Veg. 24(3):156-161.

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. J. Invert. Pathol. 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. J. Invertebrate Pathology 99:96-102.

Michaud JP. 2001. Numerical response of *Olla v-nigrum* (Coleóptera: Coccinellidae) to infestations of Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) in Florida. Florida Entomol. 84: 608-612.

Michaud JP. 2002. Biological control of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Florida: a preliminary report. Entomol. News. 113 (3): 2169-223.

Michaud JP. 2004. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. Biological Control 29: 260-269.

Michaud JP, Olsen LE. 2004. Suitability of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, as prey for ladybeetles. BioControl 49: 417-431.

Milner RJ, Pereire RM. 2000. Microbial control of urban pest cockroaches, ants and termites. In: Lacey LA, Kaya HK( eds). Field manual of techniques in invertebrate pathology. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp: 721-740.

Monzón A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. 63: 95-103.

Moore E .1996. Fundamentals of the fungi. Prentice Hall, New Jersey, USA. pp. 574.

Mustafa U, Kaur G. 2010. Studies on extracellular enzyme production in *Beuaveria bassiana* isolates. International Journal of Biotechnology and Biochemistry 6 (5): 701-713.

Obornik M, Jirku M, Dolezel D. 2001. Phylogeny of Mitosporic Entomopathogenic Fungi: Is the Genus *Paecilomyces* polyphyletic? Canadian Journal of Microbiology 47:813-819.

Osborne LS, Landa Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomologist* 75:456-471.

Padulla LFL, Alves SB. 2009. Suscetibilidad de ninfas de *Diaphorina citri* a fungos entomopatogenicos. *Arq. Inst. Biol., São Paulo* 76(2):297-302.

Papagianni M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* 22:189-259.

Pell JK, Vandenberg JD. 2002. Interactions Among the Aphid *Diuraphis noxia*, the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* and the coccinellid *Hippodamia convergens*. *Biocontrol Sci. and Technol.* 12:217-224.

Pérez L, Ramírez C. 2000. Efecto de las variables, condiciones de la fermentación y del sustrato en la producción de *Trichoderma harzianum*. Bogotá. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial.

Pokorny D, Friedrich J, Cimermam A. 1994. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotech Lett.* 16(363), 6.

Posada-Flórez FJ. 2008. Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* in Colombia. *J. Insect Sci.* 8(41):1-13.

Pruthi HS, Mani MS. 1945. Our knowledge of the insect and mite pests of citrus in India and their control. Imperial Council of Agricultural Research, Scientific Monograph No. 16. Calcutta: Government of India Press. pp 1-42.

Quereshi JA, Stansly PA. 2007. Integrated approaches for managing the Asian Citrus Psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Florida. *Proc. Florida State Hort. Soc.* 120: 110-115.

Rajanikanth P, Subbaratnam GV, Rahaman SJ. 2011. Evaluation of pathogenicity to *Spodoptera litura* Fabricius of different *Beauveria bassiana* Vuillemin isolates mass multiplied on economically viable substrates. *International Journal of Bio-resource and Stress Management* 2(3):293-297.

Reyes-Rosas MA, López-Arroyo JI, Loera-Gallardo J. 2010. Fluctuación del hongo entomopatígeno *Hirsutella citrifomis* en poblaciones del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*, en Río Bravo, Tamaulipas, México. pp: 302-310. En: López-Arroyo JI, González-Lauck VW. (Comp). Memoria:1er Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México, Monterrey, N.L., México del 8 y 9 de diciembre, 2010. Centro Regional de Investigación del Noreste (CIRNE), Campo Experimental General Terán.CD-ROM. Memoria Científica. ISBN en trámite.

Rivero-Aragón A, Grillo-Ravelo H. 2000. Natural enemies of *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) in the central region of Cuba. *Centro-Agrícola* 27 (3): 87–88.

Rodríguez LA, Arredondo HC. 2007. Teoría y aplicación del control biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. México, D.F. pp. 303

Roncal T, Ugalde U. 2003. Conidiation induction in *Penicillium*. *Res. Microbiol.* 154:539-546.

Safavi SA, Shah FA, Pakdel AK, Reza-Rasoulían G, Bandani AR, Butt TM. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* 270:116–123.

Samson RA. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Stud. Mycol.* 6: 1-119.

Samsináková A, Misiková S, Leopold J. 1971. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *Journal of Invertebrate Pathology* 18: 322-330.

Samson R, Evans H, Latgé J. 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, Berlin. 300 p.

Sánchez-González JA, Sánchez-Borja M, Arredondo-Bernal HC. 2011. Cría masiva, liberación y evaluación en campo de *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) pp.339-344. En: López-Arroyo JI, González-Lauck VW. (Comp). Memoria 2<sup>o</sup> Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México, Montecillo, Edo. de México, México. Centro Regional de Investigación del Noreste (CIRNE), Campo Experimental General Terán.CD-ROM.

Sánchez-González JA, Arredondo-Bernal HC. 2009. Entomófagos asociados al psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama en el estado de Colima. pp. 364-368. En: Zapata MR, W.M. Contreras S., A.A. Granados B. y S. L. Arriaga W. (eds.), Memorias del XXXII Congreso Nacional de Control Biológico. 4 al 6 de noviembre de 2009. Villahermosa, Tabasco, México,

Sandoval-Coronado CF, Quintero-Zapata I, Maldonado-Blanco MG, Elías-Santos M, Galán-Wong LJ. 2010. Producción de blastoesporas de *Beauveria bassiana* en un medio de cultivo líquido a base de glucosa y peptona de colágena. pp:416-419. En: Coria-Ávalos VM, Lara-Chávez MBN, Orozco-Gutiérrez G, Muñoz-Flores HJ, Sánchez-Martínez R (Eds). Memoria XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico. Michoacán, México, INIFAP-CIRPAC.

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2011. <http://www.senasica.gob.mx> [Revisado el 11 de Octubre de 2011].

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2012. <http://www.senasica.gob.mx> [Revisado el 9 de Enero de 2012].

Sahayaraj K, Karthick S. 2008. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and byproducts. *Afr. J. Biotechnol.* 7(12):1907-1910.

Sharma R, Chisti Y, Banerjee U. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19:627-662.

Skellely LH, Hoy MA. 2004. A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. *Biol. Control* 29: 14-23.

Smith R, Gula J. 1981. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *J. Invertebrate Pathol.* 37:222-230.

Smith P. 1993. Control of *Bemisia tabaci* and the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. *Biocontrol News and Information* 14:71-78.

Sparks TC, Pavloff AM, Rose RL, Clower DF. 1983. Temperature-toxicity relationships of pyrethroids on *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Anthonomus grandis* Boheman (Coleóptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 76: 243-246.

Srinivasan R, Hoy MA, Singh R, Rogers ME. 2008. Laboratory and field evaluations of silwet L-77 and kinetic alone and in combination with imidacloprid and abamectin for the management of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Fla. Entomol.* 91: 87-100.

St. Leger RJ, Charnley AK, Cooper RM. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen and insect cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 47: 295-302.

St. Leger RJ, Staples RC, Roberts DW. 1993. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isoenzymes. *J. Invertebr. Pathol.* 61: 81–84.

St. Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Rizzo NW, Roberts D. 1996a. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1257-1264.

St. Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ and Roberts DW. 1996b. Characterization and ultrastructural localization of *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 907-912.

St. Leger RJ, Roberts DW. 1997. Engineering improved mycoinsecticides. *Trends Biotechnol.* 15: 83-87.

Stauderman K, Avery P, Aristizábal L, Arthurs S. 2012. Evaluation of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Biocontrol Science and Technology* 22 (7):747-761.

Sterk G, Heuts F, Merck N, Bock J. 2002. Sensitivity of non-target arthropods and beneficial fungal species to chemical and biological plant protection products: Results of laboratory and semi-field trials. *Proceedings first International Symposium on Biological Control of Arthropods, Honolulu, Hawaii, USA, January 14-18, pp. 306-313.*

Subandiyah S, Nikoh N, Sato H, Wagiman F, Tsuyumyu S, Fukatsu T. 2000. Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homóptera:Psylloidea) in Indonesia. *Mycoscience* 41: 509–513.

Tanada Y, Kaya H. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press. San Diego, California. (USA). 666 p.

Téllez-Jurado A, Cruz-Ramírez MG, Mercado-Flores Y, Asaff-Torres A, Arana-Cuenca A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en relación de hongos entomopatogenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología* 30: 73-80.

Thomas DB. 2002. Trip report: Status of the brown citrus aphid in the Mexican state of Campeche: April 2002. USDA-ARS. Kika de la Garza Subtropical Agriculture Research Center. Weslaco, Texas. pp.9.

Tsai JH, Liu YH. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homóptera: Psyllidae) on four host plants. *J. Econ. Entomology* 93: 1721-1725.

Tsai JH, Wang JJ, Liu YH. 2002. Seasonal abundance of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in southern Florida. *Fla. Entomologist* 85: 446-451.

Toth SJ, Sparks TC. 1990. Effect of temperature on toxicity and knockdown activity of cis-permethrin, esfenvalerate, and  $\lambda$ -cyhalothrin in the cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 342-346.

United States Department of Agriculture (USDA). 2012. <http://www.usda.gov> [Revisado el 5 de Noviembre de 2012].

Vestergaard S, Gillespie AT, Butt TM, Schreiter G, Eilenberg J. 1995. Pathogenicity of the Hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Biocontrol Sci. Techn.* 5:185-192.

Vestergaard S, Cherry A, Keller S, Goettel M. 2003. Safety of hyphomycete fungi as microbial control agents. In: Hokkanen HMT, Hajek AE. (eds). *Environmental impacts of microbial insecticides*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp 35-62.

Vimala-Devi PS. 1994. Conidia production of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi* and its evaluation for control of *Spodoptera litura* (Fab.) on *Ricinus communis*. *J. Invertebr. Pathol.* 63 (2):145-150.

Volcy C, Pardo V. 1994. *Principios de Micología*. Centro de Publicaciones, Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. 141 p.

Wessels JGH. 1999. Fungi in their own right. *Fungal Genet. Biol.* 27: 134-145.

Wraight S, Jackson M, Kock S. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson C, Magan N. (eds). *Fungi as Biological Control Agent: Progress, Problems and Potencial*. CABI Publishing Series. Wallingford, U.K. pp.253-280.

Wrona B, Gleason M. 2005. Effect of surface aminoacids on the growth of *Peltaster fructicola* fungus associated with sooty blotch complex. *J. Plant Protect. Res.* 45:273-278.

Xie PH, Su C, Lin ZG. 1988. A preliminary study on an entomogenous fungus *Verticillium lecanii* of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hom.: Psyllidae). *Chin. J. Biol. 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): 343-352.

Zimmermann G. 2007a. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Techn.* 17: 553-596.

Zimmermann G. 2007 b. Review on Safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci. Techn.* 17:879-920.

Zimmermann G. 2008. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control *Biocontrol Sci. Techn.* 18 (9):865-901.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

**Q.B.P Fátima Lizeth Gandarilla Pacheco**

**Candidato para el Grado de  
Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología**

**Tesis:** Evaluación de aislados nativos de hongos entomopatógenos de zonas citrícolas sobre *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae).

**Campo de Estudio:** Biotecnología y Calidad Alimentaria.

**Datos Personales:** Nacido en Monterrey Nuevo León, el 15 de Septiembre de 1984, hija del Sr. Alberto Gandarilla Ramírez y la Sra. Ma. Isabel Pacheco Fernández.

**Educación:** Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grado obtenido: Químico Bacteriólogo Parasitólogo 2001-2007.

### **Experiencia Profesional:**

**Participación en el Proyecto:** Análisis de la variabilidad genética de hongos entomopatógenos aislados de zonas citrícolas de México (Área VI, No. 46198). SEP-CONACYT 2004-01. 30 de junio de 2005 – 30 junio de 2009.

**Realización de tesis Doctoral:** Evaluación de aislados nativos de hongos entomopatógenos de zonas citrícolas sobre *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae).

### **Publicaciones**

F.L. Gandarilla-Pacheco, H.D. Nava- González, Katiushka Arévalo-Niño, Luis Jesús Galán Wong, Myriam Elías-Santos and Isela Quintero-Zapata. 2012. Evaluation of native strains of *Isaria fumosorosea* (Wize) against *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae). Journal of Life Sciences 6(8): 957-960.

F.L. Gandarilla-Pacheco, K. Arévalo-Niño, L.J. Galán-Wong, C.F. Sandoval-Coronado, I. Quintero-Zapata. 2012. Evaluation of conidia production and mycelial growth in solid culture media from native strains of entomopathogenic fungi isolated from citrus- growing areas of Mexico. African Journal of Biotechnology 11(79): 14453-14460.

F.L.Gandarilla-Pacheco, J.I. López-Arroyo, L.J. Galán-Wong I. Quintero-Zapata. 2012. Patogenicidad de hongos entomopatógenos nativos de la zona citrícola de México sobre ninfas de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera:Psyllidae). Southwestern Entomologist. Aceptado.

F.L. Gandarilla-Pacheco, J.I. López-Arroyo, L.J. Galán–Wong, R. Rodríguez-Guerra, I. Quintero-Zapata. 2012. Optimization of pathogenicity tests for selection of native strains of entomopathogenic fungi isolated from citrus-growing areas of México on adults of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Florida Entomologist. Enviado.

### Memorias en Extenso

Gandarilla-Pacheco, F., Larralde-Corona, C.P., López-Arroyo, J.I., Lezama-Gutiérrez, R., Galán-Franco, L.A., Sandoval-Coronado, C. y Quintero-Zapata, I. 2006. Presencia de hongos entomopatógenos en suelos cultivados con cítricos en el estado de Nuevo León. pp: 512-514. En: XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. 9-10 de noviembre del 2006. Manzanillo, Colima. Sociedad Mexicana de Control Biológico. ISBN 978-968-5384-07-0

Gandarilla-Pacheco, F., Elías-Santos, M., Morales-Ramos, L.H., Morales-Loredo, A., Sandoval-Coronado, C.F., Quintero Zapata, I. y Galán Wong, L.J. 2006. Patogenicidad de cepas nativas de hongos entomopatógenos en larvas neonatas de *Trichoplusia ni*. pp: 515-517. En: XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. 9-10 de noviembre del 2006. Manzanillo, Colima. Sociedad Mexicana de Control Biológico. ISBN 978-968-5384-07-0

F. Gandarilla-Pacheco, A. Morales-Loredo, L. Galán-Franco, C. Sandoval-Coronado, I. Quintero-Zapata. 2007. Actividad de cepas nativas de hongos entomopatógenos contra *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). 6(1):513-516. En: E.G. Estrada Venegas, A. Equihua Martínez, C. Luna León y J.L. Rosas Acevedo (eds). Entomología Mexicana 2007. VII Congreso Latinoamericano de Entomología. XLII Congreso Nacional de la SME. Acapulco, Guerrero, México. 17-21 de Junio de 2007. Soc. Mex. de Entomología A.C. ISBN 968839517-X.

F. Gandarilla-Pacheco, I. Quintero-Zapata, L. Morales-Ramos, M. Elías-Santos, K. Arévalo-Niño. 2010. Aislamiento y evaluación de diferentes cepas nativas de *Beauveria* spp. en medios de cultivo líquido. pp:87-90. En: V.M. Coria Avalos, M.B. Lara Chávez, G. Orozco Gutiérrez, H.J. Muñoz Flores y R. Sánchez Martínez (eds). Memoria: XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico. Uruapan, Michoacán, México. 10-12 noviembre 2010. ISBN 978-607-425-490-7.

Gandarilla-Pacheco F.L., López-Arroyo J.I., Quintero-Zapata I., Rodríguez-Guerra R., Sandoval-Coronado C.F. 2010. Desarrollo de un método de bioensayo para la evaluación de hongos entomopatógenos contra adultos de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). pp:419-424. En: V.M. Coria Avalos, M.B. Lara Chávez, G. Orozco Gutiérrez, H.J. Muñoz Flores y R. Sánchez Martínez (eds). Memoria: XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico. Uruapan, Michoacán, México. 10-12 noviembre 2010. ISBN 978-607-425-490-7.

F.L. Gandarilla-Pacheco, J.I. López-Arroyo, I. Quintero-Zapata, R. Rodríguez-Guerra, C.F. Sandoval-Coronado. 2010. Bioensayos para la evaluación de hongos entomopatógenos contra ninfas de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). pp:327-332. En: López Arroyo, J.I., González Lauck, V.W. (Comp.). Memorias: 1er Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglobing en México. Monterrey, N.L. México. 8-9 de diciembre de 2010. ISBN en trámite. 479p.

F.L. Gandarilla Pacheco, I. Quintero Zapata, C.F. Sandoval Coronado, M. Elías Santos, L.J. Galán Wong. 2011. Selección de cepas nativas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin con actividad proteolítica y lipolítica en medios de cultivo sólido. Pp: 5-7. En: Javier Rivera De la Rosa y Mónica M. Alcalá Rodríguez (Ed). Congreso Internacional de Ingeniería Química 2011, Congreso de Innovación y Desarrollo de la Ingeniería Química 2011. Monterrey, N.L. México. 2-4 de noviembre de 2011. ISBN: 978-607-433-754-9.

F.L. Gandarilla Pacheco, I. Quintero Zapata, M. Elías Santos, M.S. Flores González, K. Arévalo Niño. 2011. Evaluación preliminar de la actividad enzimática de cepas nativas de *Isaria fumosorosea* Wize y su producción en medios de cultivo sólidos. Pp:8-10. En: Javier Rivera De la Rosa y Mónica M. Alcalá Rodríguez (Ed). Congreso Internacional de Ingeniería Química 2011, Congreso de Innovación y Desarrollo de la Ingeniería Química 2011. Monterrey, N.L. México. 2-4 de noviembre de 2011. ISBN: 978-607-433-754-9.

F.L. Gandarilla-Pacheco, J.I. López-Arroyo, I. Quintero-Zapata, R. Rodríguez-Guerra, C.F. Sandoval-Coronado. 2011. Bioensayos para la evaluación de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin contra ninfas de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Pp: 135-140. En: Elías Santos M., Arévalo Niño K., Quintero Zapata I., Solís Rojas C., Sandoval Coronado C.F., Luna Olvera H.A., Pereyra Alférez B., Morales Ramos L.H., Maldonado Blanco M G. (Editores). En: Memorias XXXIV Congreso Nacional de Control Biológico, Monterrey, N.L., México del 6-11 de noviembre de 2011. CD-ROM. Memoria Científica. ISBN 978-607-433-800-3.

F.L. Gandarilla-Pacheco, J.I. López-Arroyo, I. Quintero-Zapata, R. Rodríguez-Guerra, M. Elías Santos. 2011. Bioensayos para la evaluación de hongos entomopatógenos contra adultos de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Pp: 141-146. En: Elías Santos M., Arévalo Niño K., Quintero Zapata I., Solís Rojas C., Sandoval Coronado C.F., Luna Olvera H.A., Pereyra Alférez B., Morales Ramos L.H., Maldonado Blanco M G. (Editores). En: Memorias XXXIV Congreso Nacional de Control Biológico, Monterrey, N.L., México del 6-11 de noviembre de 2011. CD-ROM. Memoria Científica. ISBN 978-607-433-800-3.

F.L. Gandarilla-Pacheco, I. Quintero-Zapata, L.J. Galán-Wong, M. Elías-Santos, M. del S. Flores-González. 2011. Producción de conidias de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin en diferentes medios de cultivo sólido. Pp: 147-151. En: Elías Santos M., Arévalo Niño K., Quintero Zapata I., Solís Rojas C., Sandoval Coronado C.F., Luna Olvera H.A., Pereyra Alférez B., Morales Ramos L.H., Maldonado Blanco M G. (Editores). En: Memorias XXXIV Congreso Nacional de Control Biológico,

Monterrey, N.L., México del 6-11 de noviembre de 2011. CD-ROM. Memoria Científica. ISBN 978-607-433-800-3.

R. Pérez-Rodríguez, I. Quintero-Zapata, F.L.Gandarilla-Pacheco, C.F. Sandoval-Coronado, C.B. López-Alvarado. 2011. Evaluación de grano de arroz como sustrato para la producción de conidias de cepas nativas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Pp: 152-156. En: Elías Santos M., Arévalo Niño K., Quintero Zapata I., Solís Rojas C., Sandoval Coronado C.F., Luna Olvera H.A., Pereyra Alférez B., Morales Ramos L.H., Maldonado Blanco M G. (Editores). En: Memorias XXXIV Congreso Nacional de Control Biológico, Monterrey, N.L., México del 6-11 de noviembre de 2011. CD-ROM. Memoria Científica. ISBN 978-607-433-800-3..

H.D. Nava- González, I. Quintero-Zapata, F.L. Gandarilla-Pacheco, K. Arévalo-Niño, L.H. Morales-Ramos. 2011. Evaluación de cepas nativas de *Isaria fumosorosea* contra *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae). Pp: 175-179. En: Elías Santos M., Arévalo Niño K., Quintero Zapata I., Solís Rojas C., Sandoval Coronado C.F., Luna Olvera H.A., Pereyra Alférez B., Morales Ramos L.H., Maldonado Blanco M G. (Editores). En: Memorias XXXIV Congreso Nacional de Control Biológico, Monterrey, N.L., México del 6-11 de noviembre de 2011. CD-ROM. Memoria Científica. ISBN 978-607-433-800-3.

F.L. Gandarilla-Pacheco, J.I. López-Arroyo, R. Rodríguez-Guerra, M. Elías-Santos, I. Quintero-Zapata. 2011. Evaluación de hongos entomopatógenos contra *Diaphorina citri* kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en México. Pp: 373-383. In: López Arroyo, J. I., González Lauck, V.W. (Comp.). Memoria: 2.do Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México, Montecillo, Edo. De México, México del 5 y 6 de diciembre, 2011. Centro Regional de Investigación del Noreste (CIRNE), Campo Experimental General Terán. CD-ROM. Memoria Científica. ISBN en trámite. 424p.

F.L. Gandarilla-Pacheco, K. Arévalo-Niño, C.F. Sandoval-Coronado, L.H. Morales-Ramos, I. Quintero-Zapata. 2012. Producción de conidias de *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae) mediante una alternativa de cultivo bifásico. Pp:490-493. En: Sansinenea-Royano E., Zumaquero-Ríos L., Del Rincon Castro M.C. (Editores). En: Memorias XXXV Congreso Nacional de Control Biológico, Puebla, Pue., Mexico del 7-9 de noviembre de 2012. ISBN en trámite.

F.L. Gandarilla-Pacheco, M.S Flores-Gonzalez, L.J. Galán-Wong, M.Elias-Santos, I. Quintero-Zapata. 2012. Evaluación preliminar de la producción de quitinasas de cepas nativas de *Beuaveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae) en un medio de cultivo sólido. Pp:494-497. En: Sansinenea-Royano E., Zumaquero-Ríos L., Del Rincon Castro M.C. (Editores). En: Memorias XXXV Congreso Nacional de Control Biológico, Puebla, Pue., Mexico del 7-9 de noviembre de 2012. ISBN en trámite.

## Abstracts

F.L. Gandarilla-Pacheco, J.I. López-Arroyo, R. Rodríguez–Guerra, C.F. Sandoval-Coronado, I. Quintero-Zapata. Evaluation of entomopathogenic fungi isolates against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Mexico. 2nd. Annual Citrus Health Research Forum. Denver, Co. October, 4-6, 2011. Pp:18

F.L. Gandarilla-Pacheco, J.I. López-Arroyo, R. Rodríguez–Guerra, C.F. Sandoval-Coronado, I. Quintero-Zapata. Evaluation of entomopathogenic fungi isolated against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Mexico. First Conference in Subtropical Biology. University of Texas-Pan American. Edinburg, Texas. Friday January 13th 2012. Pp: 36

H.D. Nava- González, F.L. Gandarilla-Pacheco, K. Arévalo-Niño, M. Elías-Santos, I. Quintero-Zapata. Evaluation of native strains of *Isaria fumosorosea* against *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) in Mexico. First Conference in Subtropical Biology. University of Texas-Pan American. Edinburg, Texas. Friday January 13th 2012. Pp: 36

F.L. Gandarilla-Pacheco, H.D. Nava- González, K. Arévalo-Niño, M.G. Maldonado-Blanco, I. Quintero -Zapata. Evaluation of native strains of *Isaria fumosorosea* (Wize) against *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) in Mexico. International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control 45th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology August 5-9, 2012. Pp: 67

## Asesoría de Tesis

**Nombre del alumno:** Héctor Daniel Nava González

**Carrera o Especialidad:** Biólogo

**Título de la Tesis:** Actividad de cepas nativas de *Isaria fumosorosea* Wize sobre *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera:Tephritidae)

**Fecha de titulación:** Noviembre de 2012

**Nombre del alumno:** Ricardo Pérez Rodríguez

**Carrera o Especialidad:** Químico Bacteriólogo Parasitólogo

**Título de la Tesis:** Producción de conidias de cepas nativas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin en grano de arroz como sustrato

**Fecha de titulación:** en desarrollo

*Full Length Research Paper*

# Evaluation of conidia production and mycelial growth in solid culture media from native strains of entomopathogenic fungi isolated from citrus-growing areas of México

Fátima Lizeth Gandarilla-Pacheco, Katiushka Arévalo-Niño, Luis J. Galán-Wong, Carlos F. Sandoval Coronado and Isela Quintero-Zapata\*

Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Manuel L. Barragán Esq. Pedro de Alba S/N, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N. L. México C. P. 66450.

Accepted 29 August, 2012

**It is important to know the ability of native strains to carry out the process of sporulation and growth in different conditions and to determine their possible potential as biological control of pests of agricultural importance, mainly in citrus areas. The objective of this study was to evaluate five different solid culture media for the determination of the production of conidia and mycelial growth of twenty-five native isolates from the Mexican states of Sinaloa, San Luis Potosí, Nuevo León and Tamaulipas, and three collection strains using five different solid culture media. The results showed no statistical significant difference between the five media tested for the production of conidia per milliliter and mycelial growth among different isolates. However between isolates a significant difference was found. For conidia per milliliter, the isolate with the highest production of conidia was HIB-4 with an average of  $4.85 \times 10^9$  (spores/ml). With respect to mycelial growth strain Ma presented the highest value with 8.06 cm on average.**

**Key words:** Entomopathogenic fungi, esporulation, conidia, mycelial growth.

## INTRODUCTION

Entomopathogenic fungi were defined as obligate or facultative parasites of insects with a high capacity for sporulation and survival, and its greatest advantages are handling, adaptation to different environments, specificity and ability to direct penetration through the integument (Allendes and López, 2007). Almost all insects are susceptible to some diseases caused by these fungi (Alean-Carreño, 2003; Rodríguez et al., 2006). Approximately 100 genera and 700 known species of entomopathogenic fungi have been described, the most important may be mentioned genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium*, *Hirsutella*, *Aschersonia*, *Erynia*, *Entomophthora*, (Monzón, 2001; Asaff et al., 2002). Currently, worldwide, the most studied

species of entomopathogenic fungi are *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* due to its efficiency and ease of propagation in different substrates (Allendes and López, 2007; Scholte et al., 2004).

A commercial level has developed a wide variety of agar formulations to induce sporulation and the growth of fungi; among the culture media commonly used we can found the Sabaroud dextrose agar (SDA), Malt extract agar (MEA) Nutrient agar (NA) Corn meal agar (CMA) Yeast peptone dextrose agar (YPDA), Potato dextrose agar (PDA), to name a few (Kamp and Bidochka, 2002). Most of these present a media composition based on source of carbon and one nitrogen which generally vary between them and in the proportions in which they are presented as well as in its origin which may be organic or inorganic.

While we have studied the production of spores in liquid culture media of different species of

---

\*Corresponding autor. E-mail: [isela.quinterozp@uanl.edu.mx](mailto:isela.quinterozp@uanl.edu.mx).

entomopathogenic (Jackson et al., 1997; Derakhshan et al., 2008) and natural substrates such as rice, barley, oats, wheat and soybeans, among others (Figueroa et al., 2007; Posada-Flórez, 2008), the initial stages of isolation and morphological characterization of new isolates is still of vital importance for the use of plate assays because the understanding of essential aspects of fungal growth entomopathogenic can be very useful in projects for finding this microorganisms such as potential agents for managing of insect pests.

This detailed knowledge of the nutritional demands for growth and sporulation which are key elements in the stages of mass production and marketing will contribute in high proportion to the selection and continuous improvement of culture media and propagation methods suitable for large scale production of infective spores. In order to determine the ability of five different culture media commonly used in the laboratory to induce sporulation and mycelial growth in the present study we evaluated 25 native strains of three species of entomopathogenic fungi isolated from citrus-growing areas of México.

## MATERIALS AND METHODS

### Microorganisms

The native isolates of entomopathogenic fungi were obtained from citrus growing areas of México. The method used for isolation and characterization of the different species of entomopathogenic fungi were described by Galán-Franco et al. (2011). For this study were selected twenty-five isolates from the states of Sinaloa (*B. bassiana*: HIB-1, HIB-2, HIB-3, HIB-4, HIB-5, HIB-6, HIB-7, HIB-16, HIB-17,); San Luis Potosi (*B. bassiana*: HIB-8, *Isaria fumosorosea*: HIB-9); Nuevo León (*B. bassiana*: HIB-10; *M. anisopliae*: HIB-11, HIB-12; *I. fumosorosea*: HIB-20, HIB-21, HIB-26, HIB-29, HIB-30, HIB-33) and Tamaulipas (*B. bassiana*: HIB-13, HIB-14, HIB-15, HIB-18; *I. fumosorosea*: HIB-32), and three strains from the collection of the Institute of Biotechnology, FCB-UANL (*B. bassiana*: GHA), (*I. fumosorosea*: Pfr-612), (*M. anisopliae*: Ma).

### Preparation of inoculum

For each of the assessments we used the strains described before which were stored in cryogenic state (10% glycerol at -80°C) in the laboratory L-6 from the collection of the Institute of Biotechnology, FCB-UANL. Strains were thawed at room temperature in approximately 30 to 60 minutes, then were inoculated as streak in the potato dextrose- agar medium and allowed to incubate at 25 ± 2°C for a period of 14 days.

### Culture medium

#### Medium A

Potato dextrose agar (PDA) DIBICO® formulates grams per liter of bidistilled water: agar 15.0, dextrose 20.0, potato infusion 4.0, pH 5.6 ± 0.2.

#### Medium B

Potato dextrose agar (PDA) DIBICO® formulates grams per liter of bidistilled water: agar 15.0, dextrose 20.0, potato infusion 4.0, pH 5.6 ± 0.2, supplemented with 0.5% casein peptone BIOXON®.

#### Medium C

Potato dextrose agar (PDA) DIBICO® formulates grams per liter of bidistilled water: agar 15.0, dextrose 20.0, potato infusion 4.0, pH 5.6 ± 0.2, supplemented with 0.5% yeast extract DIBICO®.

#### Medium D

Yeast dextrose agar: composed of anhydrous dextrose (4%) Jalmeq®, yeast extract DIBICO® (1%) and bacteriological agar DIBICO® (1.5%).

#### Medium E

Sabouraud dextrose agar DIBICO® formulates grams per liter of bidistilled water: agar 15.0, dextrose 40.0, special peptone 10, pH 5.6 ± 0.2.

All solid media were prepared according to nutritive property adding 1000 ml of bidistilled water to each, sterilized at 121°C to 15 lbs. pressure for 15 min.

### Inoculation media

For inoculation in each of the mediums described earlier were obtained uniform sizing each of the strains and placed in the center of 100 x 15 mm Petri dishes. We incubated at 25 ± 2°C for 14 days. Each of the culture media was assessed for triplicate.

### Evaluating production of conidia

After 14 days of incubation in each culture medium, each strain was added 10 ml of bidistilled water with 0.1% Tween 80 and a bacteriological loop surface scraping was performed to obtain a concentrated solution of conidia. To determine its concentration, the total counts in a Neubauer chamber using dilutions from the concentrated solution was utilized.

### Evaluating mycelial growth

After 14 days of incubation, the diameter of the colonies in centimeters using a vernier was measured.

### Statistical analysis

The results were analyzed using IBM® SPSS® v.19. Kolmogorov-Smirnov test was initially performed to verify the normality of the data. We performed a one-way analysis of variance (ANOVA) and a comparison of Scheffé means at the 0.05 significance level.

## RESULTS

### Conidial production and mycelial growth by effect of culture medium

The average production of conidia obtained in different culture media ranged from 6.7 x 10<sup>6</sup> to 5.8 x 10<sup>9</sup> spores/

ml, corresponding to the minimum being isolated HIB-3 in medium A (PDA) and the maximum for the HIB-4 isolated in the medium D (ADY). But according to the results of the ANOVA, no significant difference ( $F = 0.817$ ,  $df = 4$   $P = 0.517$ ) exists between the five media tested for the production of conidia per milliliter between the different isolates (Table 1).

The average mycelial growth obtained in different culture media ranged from 3.13 to 8.50 centimeters, the minimum for the isolated HIB-18 in medium B (PDA supplemented with 0.5% peptone from casein) and the maximum strain in Ma media D and E (ADY, ADS). But according to the results of the ANOVA no significant difference was found ( $F=1,087$ ,  $df= 4$ ,  $P= 0.366$ ) between the five media evaluated for mycelial growth among different isolates (Table 2).

### Production of conidia and mycelial growth among isolates

The average production of conidia obtained between isolates ranged from  $1.85 \times 10^7$  to  $4.85 \times 10^9$  spores/ml, corresponding to the minimum being isolated HIB-3 and the maximum for the HIB-4 isolated. The comparison of conidia production of the different strains showed highly significant statistical differences between strains ( $F=8,727$ ;  $df=27$ ,  $P \leq 0.0001$ ). A test was performed for comparison of Scheffé means at 0.05 significance (Table 3) and it was found that HIB-4 strain had the highest conidia production between the strains tested with  $4.85 \times 10^9$  spores / ml, while strains HIB-2, HIB-3 and HIB-29 had the lowest production of conidia with  $4.70 \times 10^7$ ,  $1.85 \times 10^7$  and  $1.95 \times 10^7$ , respectively.

The average mycelial growth between strains ranged from 3.62 to 8.06 centimeters, the minimum for the isolated HIB-18 and the maximum strain Ma. The comparison of mycelial growth among different isolates showed highly significant statistical difference between strains ( $F=24,498$ ;  $df=27$ ,  $P \leq 0.0001$ ). A test was performed for comparison of Scheffé means at 0.05 significance (Table 4), which showed that the Ma strain present the greatest mycelial growth with 8.06 cm while the HIB-18 strain had the lowest with 3.62 cm.

### DISCUSSION

Sporulation is a process that involves the development of sexual or asexual spores and associated structures. It is considered that this mechanism of reproduction is controlled by genetic, hormonal, nutritional and environmental factors. The survival of fungal species depends in part on its ability to produce large quantities of viable conidia under different environmental conditions and even physical and nutritional requirements are more stringent than those required for mycelial growth (Moore,

1996). For the development of sporulation there are two major nutrient requirements that are a source of carbon and nitrogen source which is required for synthesizing amino acids, proteins, and nucleic acids necessary for the construction of protoplasm (Pérez and Ramírez, 2000). Glucose is the carbon source most widely used by the fungi followed by fructose, mannose, galactose, sucrose, lactose, maltose and polysaccharides such as starch, cellulose, pectin (Griffin, 1996), chitin (Hegedus et al., 1990), trehalose, sorbitol and mannitol (Bidochka et al., 1990). The most nitrogen preferred sources by fungi are organic nitrogen as urea and casein hydrolyzate (Griffin, 1996), peptone (Humphreys et al., 1989), yeast (Hegedus et al., 1990) corn soaking liquid (Blachere et al., 1973) and casamino acids (Jackson et al., 1997). But it also mentions the use of inorganic sources of nitrogen (Bidochka et al., 1990).

In this study we evaluated the production of conidia and mycelial growth from 25 native strains of entomopathogenic fungi as a result of different culture media widely used in the laboratory to induce growth and sporulation of various types of fungi, potato dextrose agar and Sabouraud dextrose agar which include glucose as carbon source in different proportions and three modifications by the addition of casein peptone and yeast extract as nitrogen sources. In the results no significant difference in the production of conidia and mycelial growth among growth media were evaluated. There are several factors related to the nitrogen sources that might have influenced these results. For example, casein peptone is a pancreatic digest containing all the amino acids found in the casein; moreover of fractions peptic long, and some minerals such as calcium, magnesium, potassium and sodium in small quantities, however lacks a defined content of vitamins in composition, which may have some effect on the development of sporulation and the formation of reproductive structures that requires certain concentrations of minerals or vitamins (Griffin, 1996).

The yeast extract has proven to be a source of nitrogen more efficient in promoting the mycelial growth and sporulation, however, also been reported as a limiting factor for growth and sporulation depending on the concentration used. At low concentrations of yeast (0.25 to 0.50%) the mycelial growth is below the optimum and the sporulation is low while at very high concentrations of yeast (1.75 to 2%) the mycelial growth is high and this inhibits sporulation (Vimala-Devi, 1994). The lack or deficiency of certain growth factors such as vitamins or minerals, or the concentration of yeast extract used in this study that was 0.5 to 1% could have a significant impact for the production of conidia and mycelial growth.

In addition, Moore (1996) also mentioned that fungi may differ in their ability to use various sources of carbon and nitrogen for reproduction, since the mycelial growth and conidial production may be favored by mono-saccharides such as glucose or fructose, however some

**Table 1.** Average production of conidia by the effect of different culture media tested at 14 days of incubation under laboratory conditions (25±2°C).

| Strain code | Culture medium (conidia/ml) |                            |                            |                            |                            |
|-------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|             | A                           | B                          | C                          | D                          | E                          |
| HIB-1       | 2.6x10 <sup>8</sup>         | 2.7x10 <sup>8</sup>        | 2.1x10 <sup>8</sup>        | 3.3x10 <sup>8</sup>        | 5.8x10 <sup>8</sup>        |
| HIB-2       | 3x10 <sup>7</sup>           | 2.8x10 <sup>7</sup>        | 5.9x10 <sup>7</sup>        | 1.8x10 <sup>8</sup>        | 2.8x10 <sup>7</sup>        |
| HIB-3       | 6.7x10 <sup>6</sup>         | 8.8x10 <sup>6</sup>        | 8.8x10 <sup>6</sup>        | 5x10 <sup>8</sup>          | 8.2x10 <sup>6</sup>        |
| HIB-4       | 4.1x10 <sup>9</sup>         | 8.6x10 <sup>9</sup>        | 3.2x10 <sup>9</sup>        | 9.3x10 <sup>9</sup>        | 2.8x10 <sup>9</sup>        |
| HIB-5       | 3.2x10 <sup>8</sup>         | 3.2x10 <sup>7</sup>        | 3.4x10 <sup>8</sup>        | 3.4x10 <sup>8</sup>        | 3.5x10 <sup>8</sup>        |
| HIB-6       | 1.6x10 <sup>9</sup>         | 2.0x10 <sup>9</sup>        | 4.8x10 <sup>9</sup>        | 5.8x10 <sup>9</sup>        | 5.2x10 <sup>9</sup>        |
| HIB-7       | 2.0x10 <sup>8</sup>         | 2.7x10 <sup>8</sup>        | 2.0x10 <sup>7</sup>        | 2.0x10 <sup>8</sup>        | 2.0x10 <sup>8</sup>        |
| HIB-8       | 2.2x10 <sup>7</sup>         | 3.5x10 <sup>7</sup>        | 2.4x10 <sup>7</sup>        | 1.5x10 <sup>8</sup>        | 2.3x10 <sup>8</sup>        |
| HIB-9       | 2.3x10 <sup>8</sup>         | 2.2x10 <sup>8</sup>        | 4.5x10 <sup>8</sup>        | 4.6x10 <sup>8</sup>        | 6.1x10 <sup>8</sup>        |
| HIB-10      | 3.4x10 <sup>8</sup>         | 3.3x10 <sup>8</sup>        | 3.6x10 <sup>8</sup>        | 3.9x10 <sup>8</sup>        | 2.9x10 <sup>9</sup>        |
| HIB-11      | 1.2x10 <sup>9</sup>         | 4.2x10 <sup>9</sup>        | 1.2x10 <sup>9</sup>        | 1.1x10 <sup>8</sup>        | 1.6x10 <sup>8</sup>        |
| HIB-12      | 2.6x10 <sup>9</sup>         | 2.1x10 <sup>9</sup>        | 3.2x10 <sup>9</sup>        | 1.4x10 <sup>8</sup>        | 1.2x10 <sup>8</sup>        |
| HIB-13      | 4.4x10 <sup>7</sup>         | 3.0x10 <sup>7</sup>        | 5.5x10 <sup>7</sup>        | 2.5x10 <sup>8</sup>        | 1.3x10 <sup>8</sup>        |
| HIB-14      | 6.0x10 <sup>8</sup>         | 4.9x10 <sup>7</sup>        | 6.5x10 <sup>7</sup>        | 2.8x10 <sup>8</sup>        | 2.3x10 <sup>8</sup>        |
| HIB-15      | 3.2x10 <sup>8</sup>         | 4.2x10 <sup>7</sup>        | 3.2x10 <sup>8</sup>        | 2.8x10 <sup>8</sup>        | 1.8x10 <sup>9</sup>        |
| HIB-16      | 6.5x10 <sup>7</sup>         | 4.4x10 <sup>7</sup>        | 3.7x10 <sup>7</sup>        | 3.3x10 <sup>8</sup>        | 4.0x10 <sup>7</sup>        |
| HIB-17      | 3.1x10 <sup>8</sup>         | 5.8x10 <sup>7</sup>        | 6.0x10 <sup>8</sup>        | 3.9x10 <sup>8</sup>        | 3.9x10 <sup>8</sup>        |
| HIB-18      | 4.5x10 <sup>7</sup>         | 5.7x10 <sup>7</sup>        | 5.1x10 <sup>8</sup>        | 5.4x10 <sup>7</sup>        | 2.6x10 <sup>8</sup>        |
| HIB-20      | 6.8x10 <sup>8</sup>         | 6.3x10 <sup>8</sup>        | 4.0x10 <sup>8</sup>        | 2.9x10 <sup>8</sup>        | 4.5x10 <sup>8</sup>        |
| HIB-21      | 2.5x10 <sup>8</sup>         | 1.4x10 <sup>8</sup>        | 2.9x10 <sup>8</sup>        | 3.9x10 <sup>8</sup>        | 1.7x10 <sup>8</sup>        |
| HIB-26      | 1.8x10 <sup>7</sup>         | 6.8x10 <sup>7</sup>        | 2.7x10 <sup>8</sup>        | 5.3x10 <sup>7</sup>        | 2.1x10 <sup>8</sup>        |
| HIB-29      | 1.8x10 <sup>7</sup>         | 1.7x10 <sup>7</sup>        | 2.9x10 <sup>8</sup>        | 2.2x10 <sup>7</sup>        | 1.5x10 <sup>7</sup>        |
| HIB-30      | 2.4x10 <sup>7</sup>         | 1.0x10 <sup>7</sup>        | 2.8x10 <sup>8</sup>        | 7.7x10 <sup>7</sup>        | 2.0x10 <sup>8</sup>        |
| HIB-32      | 2.3x10 <sup>8</sup>         | 3.5x10 <sup>8</sup>        | 4.0x10 <sup>8</sup>        | 1.4x10 <sup>8</sup>        | 4.1x10 <sup>8</sup>        |
| HIB-33      | 5.0x10 <sup>7</sup>         | 6.3x10 <sup>7</sup>        | 3.3x10 <sup>7</sup>        | 2.9x10 <sup>7</sup>        | 2.6x10 <sup>8</sup>        |
| GHA         | 2.6x10 <sup>8</sup>         | 2.0x10 <sup>8</sup>        | 3.4x10 <sup>8</sup>        | 5.5x10 <sup>8</sup>        | 1.6x10 <sup>8</sup>        |
| Pfr-612     | 1.05x10 <sup>8</sup>        | 1.0x10 <sup>8</sup>        | 1.82x10 <sup>8</sup>       | 1.66x10 <sup>8</sup>       | 2.0x10 <sup>8</sup>        |
| Ma          | 6.4x10 <sup>8</sup>         | 3.4x10 <sup>8</sup>        | 1.8x10 <sup>8</sup>        | 1.8x10 <sup>8</sup>        | 1.3x10 <sup>8</sup>        |
| Mean±SD     | 1.65x10 <sup>8</sup> ±0.72  | 1.42x10 <sup>8</sup> ±0.76 | 2.05x10 <sup>8</sup> ±0.68 | 2.80x10 <sup>8</sup> ±0.59 | 2.35x10 <sup>8</sup> ±0.63 |

of the nitrogen sources which allow good mycelial growth do not favor sporulation, such as asparagine and the ammonium compounds that inhibit the mycelial growth and sporulation due to the accumulation of ammonia during the somatic growth, which alkalized the medium inhibits this process.

Regarding the production of conidia and mycelial growth among different strains were found high significant differences in their ability to use different culture media. According to the results reported in this study, a strain of *B. bassiana* showed the highest conidia production between the strains tested, while two other strains of the same species showed the lowest levels which is consistent with that reported by James (2001) who observed an increase germination efficiency of *B. bassiana* and *P. fumosoroseus* with the addition of peptone and yeast extract. Smith and Grula (1981)

reported that *B. bassiana* requires exogenous carbon sources for germination and exogenous sources of nitrogen for the initial stages of hyphal growth and maintenance. Wrona and Gleason (2005) concluded that a carbon source can activate germination in some microorganisms, but a source of nitrogen is essential for germ tube elongation and hyphal growth. Some of the amino acids of said nutritional sources can induce the expression of genes which control the sporulation, as this process requires the activation of over 80 genes (Roncal and Ugalde, 2003).

The events related to fungal mycelial growth, that begins with the emergence of germ tube and end with the growing hyphae and branching to finally form a young mycelium, are also related to genetics and molecular regulation that determines the expression or repression of morphological features (Papagianni, 2004). Som

**Table 2.** Average mycelial growth effect of different culture media tested at 14 days of incubation under laboratory conditions (25±2°C).

| Strain code | Culture medium (cm) |           |           |           |           |
|-------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|             | A                   | B         | C         | D         | E         |
| HIB-1       | 4.21                | 3.40      | 3.86      | 3.85      | 4.08      |
| HIB-2       | 3.76                | 4.51      | 4.15      | 3.68      | 3.85      |
| HIB-3       | 4.78                | 4.21      | 4.13      | 4.21      | 3.66      |
| HIB-4       | 4.53                | 5.03      | 4.11      | 5.76      | 4.83      |
| HIB-5       | 4.21                | 4.25      | 4.23      | 3.56      | 4.26      |
| HIB-6       | 4.25                | 5.33      | 5.08      | 6.45      | 4.83      |
| HIB-7       | 4.76                | 4.48      | 3.88      | 4.18      | 4.76      |
| HIB-8       | 5.90                | 5.36      | 5.01      | 6.11      | 5.41      |
| HIB-9       | 7.33                | 7.56      | 7.33      | 7.76      | 7.48      |
| HIB-10      | 3.48                | 4.65      | 5.68      | 5.10      | 5.41      |
| HIB-11      | 5.78                | 5.10      | 5.71      | 5.91      | 5.75      |
| HIB-12      | 5.70                | 5.75      | 5.83      | 6.73      | 6.20      |
| HIB-13      | 4.18                | 5.35      | 5.28      | 5.36      | 5.25      |
| HIB-14      | 4.66                | 4.16      | 4.86      | 5.01      | 4.11      |
| HIB-15      | 5.21                | 6.28      | 6.46      | 5.71      | 5.48      |
| HIB-16      | 4.28                | 4.25      | 4.75      | 4.53      | 4.98      |
| HIB-17      | 5.08                | 5.03      | 4.90      | 4.31      | 5.03      |
| HIB-18      | 3.18                | 3.13      | 4.11      | 3.43      | 4.23      |
| HIB-20      | 7.36                | 7.26      | 8.03      | 7.46      | 6.81      |
| HIB-21      | 7.48                | 7.00      | 7.18      | 7.91      | 7.66      |
| HIB-26      | 6.20                | 7.28      | 7.00      | 6.53      | 6.63      |
| HIB-29      | 6.16                | 6.46      | 7.13      | 7.76      | 7.66      |
| HIB-30      | 4.93                | 6.23      | 5.78      | 7.06      | 7.73      |
| HIB-32      | 5.81                | 6.31      | 6.66      | 7.21      | 6.98      |
| HIB-33      | 6.08                | 7.23      | 7.55      | 7.83      | 7.83      |
| GHA         | 4.51                | 5.70      | 5.75      | 6.71      | 5.53      |
| Pfr-612     | 4.08                | 5.73      | 7.08      | 6.75      | 5.95      |
| Ma          | 7.81                | 7.70      | 7.80      | 8.50      | 8.50      |
| Mean±SD     | 5.20±1.24           | 5.52±1.26 | 5.69±1.32 | 5.90±1.52 | 5.74±1.38 |

microorganisms do not require nitrogen sources to germinate. James (2001) reported that some isolates of *M. anisopliae* germinated very well when using glucose as the sole source of nutrition. Similarly Li and Holdom (1995) observed that *M. anisopliae* conidia germination were the same in both agar with a nitrogen source (individual amino acids) and glucose agar without any source of organic nitrogen, and even reported a good mycelial growth *M. anisopliae* on soluble starch for mass production, indicating that the response of each microorganism nutrient sources is different. These results coincides with the reported for the strain Ma of *M. anisopliae* which had the highest mycelial growth among different strains tested in this studied.

Several experiments have been devoted to elucidate the influence of nutrition on mycelial growth and spore production in order to choose the components and concentrations optimal to increase production on a large

scale. Gao and Liu (2010) examined the effects on growth and sporulation in liquid medium and solid for *P. lilacinus* and *M. anisopliae* using various combinations of carbon and nitrogen sources different, they concluded that the results were highly variable between strains and each strain present certain nutrition requirements for the development of mycelial growth and sporulation. Safavi et al. (2007), studied the effect of nutrition on the virulence of three isolates of *B. bassiana* and one of *M. anisopliae* culturing in seven culture media with different proportions of carbon/nitrogen (C / N). They reported that the mycelial growth and the production of conidia showed differences between different species and strains. Liu and Chen (2002) they found that some carbon and nitrogen sources were good for growth in liquid and solid for *Hirsutella rhossiliensis*, while some could not be utilized either in liquid or solid.

The present study and the above investigations have

**Table 3.** Average yield of conidia per strain at 14 days of incubation under laboratory conditions (25±2°C).

| Strains code | Average yield of conidia per strain (conidia/ml) |
|--------------|--|
| HIB-1        | 3.10x10 <sup>8abc</sup>                          |
| HIB-2        | 4.70x10 <sup>7a</sup>                            |
| HIB-3        | 1.85x10 <sup>7a</sup>                            |
| HIB-4        | 4.85x10 <sup>9c</sup>                            |
| HIB-5        | 2.10x10 <sup>8abc</sup>                          |
| HIB-6        | 3.45x10 <sup>9bc</sup>                           |
| HIB-7        | 1.38x10 <sup>8abc</sup>                          |
| HIB-8        | 5.77x10 <sup>7ab</sup>                           |
| HIB-9        | 3.70x10 <sup>8abc</sup>                          |
| HIB-10       | 8.70x10 <sup>8abc</sup>                          |
| HIB-11       | 6.40x10 <sup>8abc</sup>                          |
| HIB-12       | 7.80x10 <sup>8abc</sup>                          |
| HIB-13       | 7.55x10 <sup>7ab</sup>                           |
| HIB-14       | 1.65x10 <sup>8abc</sup>                          |
| HIB-15       | 2.89x10 <sup>8abc</sup>                          |
| HIB-16       | 6.70x10 <sup>7ab</sup>                           |
| HIB-17       | 4.40x10 <sup>8abc</sup>                          |
| HIB-18       | 1.14x10 <sup>8abc</sup>                          |
| HIB-20       | 4.68x10 <sup>8abc</sup>                          |
| HIB-21       | 2.30x10 <sup>8abc</sup>                          |
| HIB-26       | 8.20x10 <sup>7abc</sup>                          |
| HIB-29       | 1.95x10 <sup>7a</sup>                            |
| HIB-30       | 1.00x10 <sup>8 abc</sup>                         |
| HIB-32       | 2.85x10 <sup>8abc</sup>                          |
| HIB-33       | 6.00x10 <sup>7ab</sup>                           |
| GHA          | 2.80x10 <sup>8abc</sup>                          |
| Pfr-612      | 1.45x10 <sup>8abc</sup>                          |
| Ma           | 2.50x10 <sup>8abc</sup>                          |
| Mean±SD      | 2.00x10 <sup>8</sup> ±0.56                       |

\*Different letters represent significant differences in the Scheffé Multiple Range test (P≤0.05).

**Table 4.** Average radial growth per strain at 14 days of incubation under laboratory conditions (25 ± 2°C).

| Strains code | Average radial growth per strain (cm) |
|--------------|---------------------------------------|
| HIB-1        | 3.88 <sup>ab</sup>                    |
| HIB-2        | 3.99 <sup>abc</sup>                   |
| HIB-3        | 4.20 <sup>abc</sup>                   |
| HIB-4        | 4.85 <sup>abcde</sup>                 |
| HIB-5        | 4.10 <sup>abc</sup>                   |
| HIB-6        | 5.19 <sup>abcdefg</sup>               |
| HIB-7        | 4.41 <sup>abcd</sup>                  |
| HIB-8        | 5.56 <sup>abcdefg</sup>               |
| HIB-9        | 7.49 <sup>gh</sup>                    |
| HIB-10       | 4.86 <sup>abcde</sup>                 |
| HIB-11       | 5.65 <sup>abcdefg</sup>               |
| HIB-12       | 6.04 <sup>bcdefgh</sup>               |
| HIB-13       | 5.08 <sup>abcdef</sup>                |

Table 4 Contd.

|         |                           |
|---------|---------------------------|
| HIB-14  | 4.56 <sup>abcd</sup>      |
| HIB-15  | 5.83 <sup>abcde fgh</sup> |
| HIB-16  | 4.56 <sup>abcd</sup>      |
| HIB-17  | 4.87 <sup>abcde</sup>     |
| HIB-18  | 3.62 <sup>a</sup>         |
| HIB-20  | 7.38 <sup>gh</sup>        |
| HIB-21  | 7.45 <sup>gh</sup>        |
| HIB-26  | 6.71 <sup>defgh</sup>     |
| HIB-29  | 7.03 <sup>efgh</sup>      |
| HIB-30  | 6.35 <sup>cdefgh</sup>    |
| HIB-32  | 6.59 <sup>defgh</sup>     |
| HIB-33  | 7.30 <sup>gh</sup>        |
| GHA     | 5.64 <sup>abcdefg</sup>   |
| Pfr-612 | 5.92 <sup>abcde fgh</sup> |
| Ma      | 8.06 <sup>h</sup>         |
| Mean±SD | 5.61±1.27                 |

\*Different letters represent significant differences in the Scheffé Multiple Range test ( $P \leq 0.05$ ).

sought help to elucidate the effect of different sources of carbon and nitrogen and the relationship between these elements as high factors impact on growth and sporulation of entomopathogenic fungal and aided the selection of the best strains that may have potential as biological control agents.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported with funds provided by the Project PAICYT GCN041-10 and PROMEP /103.5/09/1306, P/CA: UANL-CA- 11.

## REFERENCES

- Alean-Carreño I (2003). Evaluation of the pathogenicity of different entomopathogenic fungi for control of the cassava whitefly *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera:Aleyrodidae) under greenhouse. PhD dissertation, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. pp. 33-52.
- Allendes LG, Lopez EL (2007). Evaluation of eight native strains of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin for control of *Aleurothrixus floccosus* Maskell.. PhD dissertation, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile. p. 40.
- Asaff TA, Reyes VY, López EV, De la Torre M (2002). War between insects and microorganisms: a natural strategy for pest control. *Avance y Perspectiva*. 21:291-295.
- Bidochka M, Low N, Khachatourians G (1990). Carbohydrate storage in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3186-3190.
- Blachère H, Calvez J, Ferron P, Corrieu G, Peringer P (1973). Etude de la formulation et de la conservation d'une preparation entomopathogime a base de blastospores de *Beauveria tenella* (Delacr. Siemaszko). *Annales de Zoologie Ecologie Animale* 5(1):69-79.
- Derakhshan A, Rabindra RJ, Ramanujam B, Rahimi M (2008). Evaluation of different media and methods of cultivation on the production and viability of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. *Pak. J. Biol. Sci.* 11(11):1506-1509.
- Figueroa LM, Varela A, Corredor D (2007). Evaluation of natural substrates for mass propagation of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Revista de Investigación*. 7(1):127-131.
- Galán-Franco LA, Morales-Loredo A, Álvarez-Ojeda G, López-Arroyo JI, Arévalo-Niño K, Sandoval-Coronado C, Quintero-Zapata I (2011). Isolation and characterization of entomopathogenic fungi obtained from citrus-growing areas of Mexico. *Southwestern Entomol.* 36(4):443-449.
- Hegedus D, Bidochka M, Khachatourians G (1990). *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33:641-647.
- Humphreys AM, Matewale P, Trinci AP, Gillespie AT (1989). Effects of water activity on morphology, growth, and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Paecilomyces farinosus* in batch and fed batch culture. *Mycol. Res.* 92(3):257-264.
- James R (2001). Effects of exogenous nutrients on conidial germination and virulence against the Silverleaf Whitefly for two hyphomycetes. *J. Invertebrate Pathol.* 77:99-107.
- Jackson MA, McGuire MR, Lacey LA, Wraight SP (1997). Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol. Res.* 101(1):35-41.
- Kamp AM, Bidochka MJ (2002). Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Lett. Appl. Microbiol.* 35:74-77
- Gao L, Liu X (2010). Nutritional requirements of mycelial growth and sporulation of several biocontrol fungi in submerged and on solid culture. *Microbiol.* 79(5):612-619.
- Griffin DH (1996). *Fungal physiology*. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, USA. pp.102-127, 260-279.
- Monzón A (2001). Production, use and quality control of entomopathogenic fungi in Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas.* 63:95-103.
- Moore E (1996). *Fundamentals of the fungi*. Prentice Hall, New Jersey, USA. pp. 574
- Li DP, Holdom DG (1995). Effects of nutrients on colony Formation, growth, and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J. Invert. Pathol.* 65(3):253-260.
- Liu XZ, Chen SY (2002). Nutritional requirement of the nematophagous fungus *Hirsutiella rhossiliensis*. *Biocontrol Sci. Technol.* 12:381-393.

- Papagianni M (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* 22:189-259.
- Posada-Flórez FJ (2008). Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* in Colombia. *J. Insect Sci.* 8(41):1-13.
- Pérez L, Ramírez C (2000). Effect of the variables, conditions of fermentation and the substrate in the production of *Trichoderma harzianum*. PhD dissertation, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. p. 153.
- Rodríguez MS, Gerding M, France A (2006). Selection of isolates of entomopathogenic fungi for control of eggs of the tomato moth, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae). *AgriculturaTécnica.* 66(2):151-158.
- Roncal T, Ugalde U (2003). Conidiation induction in *Penicillium*. *Res. Microbiol.* 154:539-546.
- Safavi SA, Shah FA, Pakdel AK, Reza-Rasoulian G, Bandani AR, Butt TM (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* 270:116-123.
- Scholte EJ, Knols BGJ, Samson RA, Takken W (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *J. Insect Sci.* 4(19):24.
- Smith R, Gula J (1981). Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *J. Invertebrate Pathol.* 37:222-230.
- Vimala-Devi PS (1994). Conidia production of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* and its evaluation for control of *Spodoptera litura* (Fab.) on *Ricinus communis*. *J. Invert. Pathol.* 63(2):145-150.
- Wrona B, Gleason M (2005). Effect of surface aminoacids on the growth of *Peltaster fructicola* fungus associated with sooty blotch complex. *J. Plant Protect. Res.* 45:273-278.

# Evaluation of Native Strains of *Isaria fumosorosea* (Wize) Against *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae)

Fátima Lizeth Gandarilla-Pacheco, Héctor Daniel Nava-González, Katiushka Arévalo-Niño, Luis Jesús Galán-Wong, Myriam Elías-Santos and Isela Quintero-Zapata

Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L. 66450, México

Received: March 15, 2012 / Accepted: April 27, 2012 / Published: August 30, 2012.

**Abstract:** We evaluated the pathogenicity of six strains *I. fumosorosea* to determine their potential as biological control agents of *A. ludens* by performing bioassays under laboratory conditions ( $25 \pm 2$  °C,  $60 \pm 5\%$  R.H and 12:12 h L: D) exposing larvae and pupae to a concentration of  $1 \times 10^8$  conidia per milliliter using three different methods: direct spraying, spray of soil and submerged for both instars. The results showed that direct spraying method Pfr-612 strain showed the highest mortality (47%) in pupae while for larvae was strain HIB-27 to 46%. Regarding spray of soil Pfr-612 strain showed the highest percentage of mortality for pupae and larvae with 45 and 57% mortality, respectively. Finally, for the submerged method in pupae HIB-27 strain showed 62% mortality whereas in larvae HIB-32 strain showed 46%. These results indicate that *A. ludens* is susceptible in at least two instars to *I. fumosorosea* and make this fungus a promising agent for control of the Mexican fruit fly.

**Key words:** *A. ludens*, biological control, entomopathogenic fungi, *I. fumosorosea*.

## 1. Introduction

The Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) is a pest that seriously affect fruit production in Mexico and other countries Neotropical. This insect is considered one of the main pests that affect fruit crops worldwide [1]. EI damage is caused by larvae feeding on the pulp are deteriorating galleries fruit and allowing the invasion of other organisms such as fungi and bacteria that increase the damage by rot, which causes premature decline and loss of fruit. In Mexico, *A. ludens* is distributed mainly in the production areas of mango, orange, guava, apple and peach, covering 49.75% of the country [2].

*A. ludens* is capable of causing direct damage estimated at 30% loss in production, marketing and

hinder due to the imposition of strict quarantine barrier [3]. The battle of the fruit flies in Mexico is conducted through various methods with a trend toward integrated pest management, with the primary methods of pest control are the legal, mechanical, cultural, insect technique sterile, chemical and biological [4]. Chemical control is based on the use of bait insecticides to control adults and land application of insecticides to kill larvae and newly emerged adults, but this type of control causes high pollution and mortality of beneficial insects [5-7].

Furthermore, the use of biological control offers alternatives to avoid side effects by use of chemical agents. Biological control of tephritid pest has been primarily through mass releases of parasitoids *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) and *D. tryoni* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) [8, 9]. So far, the documentation of the activity of entomopathogenic fungi against *A. ludens* in Mexico, little being reduced

---

**Corresponding author:** Isela Quintero-Zapata, Ph.D., professor, research field: agricultural biotechnology with accentuation in biological control with entomopathogenic fungi. E-mail: isela.quinterozp@uanl.edu.mx.

to the evaluation of *Metharizium anisopliae* strains (Metschnikoff) Sorokin [10, 11], however, there are no reports documenting the implementation of methods to assess the pathogenicity of isolates of other genera and/or species of entomopathogenic fungi against the different stages of *A. ludens* in the laboratory, therefore the objective of this study was to determine the toxic activity of native strains of *I. fumosorosea* in two stages of *A. ludens*.

## 2. Materials and Methods

**Obtaining insects:** The Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens*, used for these bioassays was originated from our colony maintained in insect breeding area at the Institute of Biotechnology of the UANL, in Nuevo León, Mexico on artificial diet under laboratory Conditions at  $25 \pm 2$  °C,  $60 \pm 5\%$  R.H and 12:12 h L:D.

**Activation of the strains:** We used native strains of *I. fumosorosea* isolated from citrus-growing areas in Mexico (HIB-27, HIB-28, HIB-29, HIB and HIB-30-32) and Pfr-612 from the collection of the Institute of Biotechnology, FCB-UANL, stored in cryogenic state (10% glycerol at  $-80$  °C). The strains were thawed at room temperature were then inoculated as a striated in potato dextrose agar (PDA) and incubated at  $28$  °C for 14-21 days.

**Preparation of conidial suspension:** After incubation time for each strain was added 10 mL of bidistilled water with 0.01% Tween-80 and adjusted to a concentration of  $1 \times 10^8$  conidia/mL in a Neubauer chamber.

**Preparing the soil:** Different soil samples were sieved and sterilized, placing 200 g in plastic containers of 1,000 mL with 75% humidity.

**Bioassays:** Three methods were used for the treatment of larvae and pupae:

**Direct spray:** We sprayed directly the pupae and larvae with the conidia solution ( $1 \times 10^8$ ) corresponding to each strain then larvae placed in containers with sterile soil.

**Submerged:** Consisted of immersing larvae and

pupae for 30-35 seconds in the solution of conidia ( $1 \times 10^8$ ) then filtering the suspension with a thick paper towel, then placed in containers with sterile soil.

**Spray of soil:** Sterilized soil was sprayed with the conidia solution ( $1 \times 10^8$ ) corresponding to each strain. Then add larvae and pupae of *A. ludens* to each container with soil.

**Incubation of bioassays:** There were 15 repetitions for each of the treatments included a control with 0.01% Tween 80 and an absolute control. All containers, once covered were reversed, and remained at  $25 \pm 2$  °C for three days [12] to allow *A. ludens* become infected with fungi [13, 14]. After this time, larvae and pupae were extracted and placed in Petri dishes ( $60 \times 15$  mm) in a chamber at  $26-28$  °C and a relative humidity of 60-65% for 7 days to encourage the development of mycosis and check the mortality due to fungus. Reported the final mortality rate in percentage for each of the entomopathogenic fungi.

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Bioassay with Pupae

For mortality of pupae of *A. ludens* strain that produced the highest mortality was strain HIB-27 (62%) by the method of submerged, whereas the remaining strains obtained values ranging between 22% and 47%. For soil spraying method, the strain was highest death rate was the Pfr-612 strain (45%), while the other strains yielded rates below 50%. For the method of direct spray the strain obtained pupae increased mortality rate was Pfr-612 (47%), while the other strains ranged between 24% and 34% (Table 1). The minimum values for bioassays with pupae of *A. ludens* were recorded in controls (absolute = 0%, Tween 80 = 15%).

### 3.2 Bioassay with Larvae

In the bioassay by the method of spraying soil treatments evaluated caused an average mortality of 20-57% for larvae of *A. ludens* while Pfr-612 strain

**Table 1 Mortality of pupae of *Anastrepha ludens* caused by strains of *Isaria fumosorosea* under laboratory conditions (25 ± 2 °C, 60 ± 5% R.H and 12:12 h L:D).**

| Strain code      | Methods (percentage of final mortality) |               |           |
|------------------|---|---------------|-----------|
|                  | Direct spray                            | Spray of soil | Submerged |
| HIB-27           | 34                                      | 44            | 62        |
| HIB-28           | 30                                      | 32            | 31        |
| HIB-29           | 29                                      | 35            | 33        |
| HIB-30           | 24                                      | 34            | 22        |
| HIB-32           | 30                                      | 26            | 22        |
| Pfr-612          | 47                                      | 45            | 41        |
| Absolute control | 0                                       | 0             | 0         |
| Tween 80 control | 0                                       | 0             | 0         |

produced the highest mortality (57%). On the other hand in the bioassay with the direct spray method larvae HIB-27 strain caused higher mortality (46%), whereas the remaining strains showed lower values from 40 to 42%. Finally in the bioassay method of submerged larvae, HIB-32 strain showed higher mortality (46%) while the average mortality caused by the different treatments evaluated are presented in the range of 27-40% (Table 2). The minimum values for larval bioassays were recorded in controls (absolute = 0%, Tween 80 = 0%).

In the bioassays described in this paper the results show that *A. ludens* is susceptible in its larval stage to *I. fumosorosea*. A study reports that in evaluating seven different strains of entomopathogenic fungi on *Ceratitis capitata* Wiedemann (Mediterranean fruit fly) found that *M. anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* (= *I. fumosorosea*) were the most pathogenic fungi with LD<sub>50</sub> values of 5.1 and 6.1 × 10<sup>3</sup>

**Table 2 Mortality of larvae of *Anastrepha ludens* caused by strains of *Isaria fumosorosea* under laboratory conditions (25 ± 2 °C, 60 ± 5% R.H and 12:12 h L: D).**

| Strain code      | Methods (percentage of final mortality) |               |           |
|------------------|---|---------------|-----------|
|                  | Direct spray                            | Spray of soil | Submerged |
| HIB-27           | 46                                      | 42            | 33        |
| HIB-28           | 27                                      | 38            | 33        |
| HIB-29           | 42                                      | 34            | 37        |
| HIB-30           | 42                                      | 20            | 27        |
| HIB-32           | 40                                      | 38            | 46        |
| Pfr-612          | 41                                      | 57            | 40        |
| Absolute control | 0                                       | 0             | 0         |
| Tween 80 control | 0                                       | 0             | 0         |

conidia/fly, respectively [15]. Also to evaluate extracts was reported that *M. anisopliae* was more toxic, with a 90% mortality at a concentration of 25 mg of diet and also fertility was reduced to 94 and 53% respectively. Furthermore in other study evaluated the susceptibility of *A. ludens* to *Beauveria bassiana*, *Metarhizium* spp. and *P. fumosoroseus* with conidial suspensions at a concentration of 1 × 10<sup>8</sup>, finding that *Metarhizium* spp. 100% of the pupae subjected to bioassay showed invasion of the fungus, while in the adult stage bioassays was observed in individuals infected by hyphal growth of the fungus on the cuticle of the same [16] consistent with other similar studies who reported that at a concentration of 10<sup>8</sup> CFU/mL showed a cumulative mortality of larvae and pupae of *A. ludens* in a range of 37.5-98.75% [11].

#### 4. Conclusions

According to the results need to be continued at laboratory bioassays to determine the appropriate concentration that causes mortality of larvae and pupae of *A. ludens*, and the method of bioassay and the use of native isolates of entomopathogenic fungi for control of flies Mexican fruit.

#### Acknowledgments

The authors thank Mr. Feliciano Molina who assisted with various aspects of this research.

#### References

- [1] V. Hernández-Ortiz, M. Aluja, Listado de especies del género neotropical *Anastrepha* (Díptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas, Folia Entomológica Mexicana 88 (1993) 89-105.
- [2] Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) Home page, <http://www.senasica.gob.mx/?id=1002> (Accesed Jan. 9, 2012)
- [3] J.I. López-Arroyo, M. Cruz-Fernández, J. Loera-Gallardo, Reporte Anual de Investigación e Innovación Tecnológica, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias(INIFAP), 2007.
- [4] M. Aluja, Bionomics and management of *Anastrepha*, Annual Review of Entomology 39(1994) 155-178.
- [5] D. Penrose, The 1989/1990 Mediterranean fruit fly

**Evaluation of Native Strains of *Isaria fumosorosea* (Wize) Against  
*Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae)**

- eradication program in California, in: M. Aluja, P. Liedo (Eds.), *Fruit Flies: Biology and Management*, Springer-Verlog, New York, 1993, pp. 441-446.
- [6] N.E. Gary, E.C. Mussen, Impact of Mediterranean fruit fly malathion bait spray on honey bees, *Environmental Entomology* 13 (3) (1984) 711-717.
- [7] R.H. Messing, Status and needs of biological control researcher for tephritid flies, in: B.A. McPherson, G.J. Steck(Eds.), *Fruit Fly Pest: A World Assessment of Their Biology and Management*, Lucie Press, Florida, USA, 1996, pp. 365-369.
- [8] M.L. Martínez, H. Bravo, J. López, J.L. Leyva, J. Trujillo, Supervivencia y fecundidad de *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenóptera: Braconidae) parasitoide de la mosca de la fruta (Díptera: Tephritidae), *Agrociencia* 3 (1992) 53-67.
- [9] P. Montoya, J. Cancino, Control Biológico por aumento en moscas de la fruta (Díptera: Tephritidae), *Folia Entomológica Mexicana* 43 (2004) 257-270.
- [10] A.T.E. García, C.L. Messias, H.M.L. de Souza, A.E Piedrabuena, Patogenicidade de *Metharizium anisopliae* var. *anisopliae* a *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae), *Revista Brasileira de Entomología* 28(1984) 421-424.
- [11] R. Lezama-Gutiérrez, A. Trujillo-de la Luz, J. Molina-Ochoa, O. Rebolledo-Domínguez, A.R. Pescador, M. López-Edwards, et al., Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae): Laboratory and Field Trials, *Journal of Economic Entomology* 93(4) (2000)1080-1084.
- [12] S.P. Stock, B.M. Pryor, H.K. Kaya, Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA, *Biodiv. Conserv.* 8(1999) 535-549.
- [13] J.L. Woodring, H.K. Kaya, Steinernematid and heterorhabditid nematodes: A handbook of techniques, Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, Arkansas, USA, 1988.
- [14] X. Fan, W.M. Hominick, Efficiency of the *Galleria* (wax moth) baiting technique for recovering infective stages of entomopathogenic rhabditids (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from sand and soil, *Revue de Nématologie* 14 (1991) 381-387.
- [15] M.A. Castillo, P. Moya, E. Hernández, E. Primo-Yúfera, Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extract, *Biological Control* 19 (2000) 274-282.
- [16] K. Arévalo-Niño, M.G. Rojas-Verde, A. Saucedo-Casados, L. Morales-Ramos, E. Huerta-Alemán, C. Solís-Rojas, Susceptibilidad de la mosca mexicana de la fruta *Anastrepha ludens* (Loew) (Díptera: Tephritidae) a hongos entomopatógenos: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium spp.* y *Paecilomyces fumosoroseus*, en laboratorio, *Entomología Mexicana* 6(1) (2007)508-512.



Estimada Dra. Isela Quintero-Zapata: me es grato comunicarle que su manuscrito 'Patogenicidad de hongos entomopatógenos nativos de la zona citrícola de México sobre ninfas de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae)' de los autores Fátima Lizeth Gandarilla-Pacheco, José I. López-Arroyo, Luis J. Galán-Wong, e Isela Quintero-Zapata, ha sido aceptado para publicarse en la revista *Southwestern Entomologist*, después de haber atendido las sugerencias hechas por un par e revisores. Espero poder leer su nueva versión del manuscrito SWE#2276 pronto.

Sin más por el momento reciba un afectuosos saludo y le agradecemos su interés de publicar su interesante trabajo en nuestra revista.

Atentamente,

*Carlos A. Blanco*

Carlos A. Blanco, Editor asociado

[Carlos.a.blanco@aphis.usda.gov](mailto:Carlos.a.blanco@aphis.usda.gov) / [carlos.blanco1206@gmail.com](mailto:carlos.blanco1206@gmail.com)

Cc. Dr. Bonnie Pendleton, Editor-in-Chief