



IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Diaphorina citri* EN ÁRBOLES DE CÍTRICOS†

[IDENTIFICATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FOR THE BIOLOGICAL CONTROL OF *Diaphorina citri* IN CITRUS TREES]

Mahatma Gandhi Landa-Cadena¹, Ángel Trigos¹,
Francisco Hernández-Rosas² and Alejandro Salinas-Castro^{1*}

¹Centro de Investigación en Micología Aplicada, Universidad Veracruzana, Médicos 5, U.H. del Bosque, Xalapa-Enríquez, C.P. 91110, Veracruz México. Tel. 52 (228) 840 42 55. Email: gandhi19@live.com.mx, atrigos@uv.mx, asalin@uv.mx*

²Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba, Carretera federal Córdoba-Veracruz km 348, C.P. 94946, Veracruz, México. Tel. 52 (271) 716 60 00 / 57 / 55 Ext. 64824.

Email: fhrosas@colpos.mx

*Corresponding author

SUMMARY

Background. Entomopathogenic fungi represent a sustainable alternative to reduce populations of the asian citrus psyllid *Diaphorina citri*, which acts as the vector of the pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus*, responsible for Huanglongbing (HLB) in citrus fruits. **Objective.** To identify morpho-taxonomic and molecular endophytic entomopathogenic fungi in persian lime, for use in the biological control of *D. citri* Veracruz. **Methodology.** The study was carried out in a persian lime *Citrus latifolia* crop in the Martínez de la Torre district, Veracruz, sampling was directed at trees that had myconized *D. citri* adults, on branches with tender shoots and mature leaflets. The fungi were isolated, purified and identified morphologically and morphometrically, and corroborated by molecular biology, through DNA amplification and sequencing of the ITS intergenic region. Under greenhouse conditions, the strains were inoculated by the method of flooding conidia in the basal part of stems and root system of Persian lime plants. In each treatment, 100 nymphs of the second stage of *D. citri* were released to evaluate the percentage of myconization and its endophytic establishment of fungal strains. **Results.** The taxonomic morphology of the reproductive structures of the identified fungal species and compared with the sequences reported in the Gen Bank, gave high identity with the endophytic entomopathogenic fungi *Acrodontium crateriforme*, *Hirsutella citriformis*, *Isaria fumosorosea*, *Metharizium anisopliae*, *Trichoderma harzianum*, for the strain *A. crateriforme* is first time that it was found miconizing *D.citri* naturally. **Implications.** These findings indicate new areas of study related to endophytic entomopathogenic fungi as biological control agents, which can influence the regulation of asian psyllid populations, to reduce the incidence of the spread of HLB in citrus growing areas. **Conclusions.** The strains *A. crateriforme* were identified with a mortality percentage of 90%, *M. anisopliae* with 85%, *H. citriformis* with 68%, *I. fumosorosea* 65% and *T. harzianum* with 50%, they had an endophytic entomopathogenic behavior, and it was shown that the five strains colonized persian lime trees by the method of direct flooding of conidia at the base of the stem and roots, mummifying adults of the citrus psyllid under greenhouse conditions.

Key words: endophyte fungi; persian lime; flood method; asian psyllid.

RESUMEN

Background. Los hongos entomopatógenos representan una alternativa sostenible para reducir las poblaciones del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*, el cual actúa como vector del patógeno *Candidatus Liberibacter asiaticus*, responsable del Huanglongbing (HLB) en los cítricos. **Objetivo.** Identificar morfotaxonomía y molecular a hongos entomopatógenos endófitos en lima persa, para ser usados en el control biológico de *D. citri* Veracruz. **Metodología.** El estudio se realizó en cultivo de lima persa *Citrus latifolia* en el distrito Martínez de la Torre, Veracruz, el muestreo fue dirigido en árboles que tenían adultos *D. citri* miconizados, en ramas con brotes tiernos y folíolos maduros. Los hongos fueron aislados, purificados e identificados de forma morfológica y morfométrica, y corroborados por biología molecular, mediante la amplificación del ADN y secuenciación de la región intergénica

† Submitted July 10, 2024 – Accepted January 8, 2025. <http://doi.org/10.56369/tsaes.5733>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = Mahatma Gandhi Landa-Cadena: <http://orcid.org/0009-0005-4235-3386>; Ángel Trigos: <http://orcid.org/0000-0001-6112-2288>; Francisco Hernández-Rosas: <http://orcid.org/0000-0003-3718-3245>; Alejandro Salinas-Castro: <http://orcid.org/0000-0001-7169-7675>

ITS. En condiciones de invernadero, las cepas fueron inoculadas mediante el método de inundación de conidios en la parte basal de tallos y sistema radicular de las plantas de lima persa, en cada tratamiento se liberaron 100 ninfas del segundo estadio de *D. citri* para evaluar el porcentaje de miconización y su establecimiento endófito de las cepas fúngicas. **Resultados.** La morfología taxonómica de las estructuras reproductivas de las especies de hongos identificados y comparadas con las secuencias reportadas en el Gen Bank, dio alta identidad con los hongos entomopatógenos endófitos *Acrodontium crateriforme*, *Hirsutella citrififormis*, *Isaria fumosorosea*, *Metharizium anisopliae*, *Trichoderma harzanium*, para la cepa *A. crateriforme* es la primera vez que se encontró miconizando a *D. citri* de forma natural. **Implicaciones.** Estos hallazgos indican nuevas áreas de estudio relacionadas con los hongos entomopatógenos endófitos como agentes de control biológico, que pueden influir en la regulación de las poblaciones del psílido asiático, para reducir la incidencia de la propagación del HLB en las zonas cítricas. **Conclusiones.** Se identificaron a las cepas *A. crateriforme* con un porcentaje de mortandad del 90%, *M. anisopliae* con el 85%, *H. citrififormis* con el 68%, *I. fumosorosea* 65% y *T. harzanium* con 50%, tuvieron un comportamiento entomopatógeno endófito, y se demostró que las cinco cepas colonizaron los árboles de lima persa por el método de inundación de conidios directa en la base del tallo y raíces, momificaron a adultos del psílido de los cítricos en condiciones de invernadero.

Palabras clave: hongos endófitos; lima persa; método por inundación; psílido asiático.

INTRODUCCIÓN

La citricultura a nivel mundial se ve amenazada por la enfermedad del Huanglongbing (HLB) de los cítricos, la cual es transmitida por el insecto vector *D. citri* (Hemiptera: Liviidae) conocido como psílido asiático, cada que se alimenta de una planta de cítricos, transmite la bacteria *C. L. asiaticus* responsable del HLB, que afecta la calidad del fruto, el rendimiento y ocasiona la muerte de los árboles. En México la presencia de *D. citri* fue reportada por primera vez en el 2002 en los estados de Campeche y Quintana Roo, el acontecimiento fue significativo por la exportación de la lima persa, en la actualidad el psílido asiático se encuentra distribuido en las principales zonas productoras de este cultivo, es una de las actividades agrícolas que generan recursos económicos y la presencia de *D. citri* podría generar pérdidas en la producción (Hodges y Spreen, 2011). De acuerdo con el SIAP (2023), Veracruz es el principal productor de lima persa con 52,857.46 ha sembradas y el distrito de Martínez de la Torre cuenta con el 67% de superficie cultivada.

Existen en la naturaleza hongos entomopatógenos que actúan como endófitos (HEE), son agentes de control biológico y en los últimos años han aumentado el uso en la agricultura, son promotores de crecimiento y afectan de manera eficientes el manejo de plagas agrícolas de importancia económica (Ortiz-Espinoza et al., 2020).

En un insecto plaga o patógenos específicos, los microorganismos endófitos pueden tener uno o más mecanismos de acción relacionados con su capacidad para actuar como agentes de biocontrol. Se clasifican principalmente como mecanismos químicos o indirectos que resultan de limitar e inhibir metabolitos primarios y secundarios, enzimas o compuestos orgánicos volátiles eficaces en otras plagas competidoras (Aragón y Beltrán-Acosta,

2018). Por ejemplo, producen ácido indolacético que es una auxina que desarrolla el alargamiento celular y el crecimiento de las raíces, la hormona giberelina estimulan la germinación de semillas y el crecimiento de brotes tiernos y la citosina que promueven la división celular y el crecimiento de las yemas laterales de las plantas (Sahayaraj y Namasivayam, 2008; Karthi et al., 2024).

En Argentina en huertos de naranja aislaron las cepas entomopatógenas *M. anisopliae*, *Isaria javanica* y *Beauveria bassiana* en adultos del psílido asiático, luego las evaluaron en campo para el control biológico de las poblaciones de *D. citri* en ninfas y adultos por el método de aspersión directa en plantas e inoculación directa al insecto plaga, (Augier et al., 2023). Datos similares se obtuvieron en México en laboratorio y vivero con las cepas *H. citrififormis*, *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* (Lezama-Gutiérrez et al., 2011). La cepa *H. citrififormis* la han aislado en huertas de cítricos de adultos miconizados de *D. citri* en Chiapas, Campeche, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Yucatán y Veracruz (Pérez-González et al., 2015). En la zona cítrica de Colima se aislaron e identificaron morfológica, morfométrica y por biología molecular 30 cepas entomopatógenas de los géneros *Beauveria*, *Hirsutella*, *Isaria*, *Simplicillium* en ninfas y adultos de *D. citri*, asimismo los géneros *Batkoa* sp. y *Entomophthora* sp. solo fueron identificarlos morfológica y morfométrica (Berlanga-Padilla et al., 2018).

El potencial de los endófitos para el manejo de insectos plagas y enfermedades en cultivos de importancia en la agricultura, la exploración de estos microorganismos solo se podrá llevar a cabo si se realizan investigaciones en condiciones controladas, se utilicen técnicas precisas para su identificación y producción a nivel industrial. Es necesario seguir investigando hongos entomopatógenos endófitos e identificar de forma taxonómica cepas virulentas para

su aplicación en campo, asimismo se requiere incrementar el conocimiento acerca de las interacciones ecológicas entre la planta hospedera y el hongo endófito, así como los insectos plaga y benéficos. La aplicación de hongos endófitos en el manejo de problemas fitosanitarios puede resultar una ventaja en el crecimiento de la planta lo que permitirá aprovechar el potencial nutritivo, inmunológico y de resistencia a condiciones adversas de estos microorganismos (Aragón y Beltrán-Acosta, 2018).

Los HEE poseen plasticidad para adaptarse y miconizar en condiciones de baja o alta humedad, siempre que se encuentre el hospedero (Ferron, 1978; Moore *et al.*, 1995). Por tanto, el objetivo fue identificar morfotaxonómica y molecular a hongos entomopatógenos endófitos en lima persa *Citrus latifolia*, para ser usados en el control biológico de *D. citri* en Veracruz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El trabajo se realizó en una huerta de dos ha de *C. latifolia* con pendiente del 10%, la plantación tenía 10 años con un arreglo de marco real con 100 árboles por ha y donde solo se realizan labores de chapeo, podas y fertilización química al suelo. En el distrito Martínez de la Torre, Veracruz, México. Las coordenadas geográficas son 20° 02' 57.0012" N y 97° 05' 31.9992" W con una elevación de 80 m s. n. m, con una temperatura que oscila entre los 21 y 35 °C, precipitación pluvial anual de 1500 mm. El clima es cálido húmedo con lluvias en verano (Aw), esto de acuerdo con la clasificación mundial de Köppen (Rubel y Kottek, 2010).

Muestreo

La recolección de psílidos asiáticos se realizó en el periodo de marzo a mayo de 2022 y se repitió en el 2023, el muestreo fue dirigido en árboles que tenían adultos *D. citri* miconizados, en ramas con brotes tiernos y folíolos maduros. Las muestras se depositaron en viales y las hojas en bolsa de ziploc, se llevaron al Centro de Investigación de Micología Aplicada (CIMA), los insectos con micosis fueron desinfectados para eliminar contaminantes externos y que no intervinieran en el proceso de aislamiento y cultivo de los hongos, se procedió a lavarlos durante 30 s con agua destilada estéril, luego se sumergieron por 60 s en una solución de hipoclorito de sodio al 4%, inmediato se desinfectaron por 30 s con etanol al 70%, en seguida se enjuagaron por 60 s en agua destilada estéril, se sumergieron por 60 s en estreptomomicina al 0.05%, por último, se enjuagó

durante 30 s con agua destilada estéril (Sánchez-Peña *et al.*, 2011).

Una vez desinfectados, con el apoyo de un microscopio estereoscópico (Carls Zeiss Stemi 1000), pinzas y bisturí esterilizados con flama de mechero, se cortaron partes del insecto que mostraban signos de micosis, de forma inmediata dentro de una campana de flujo laminar y bajo el microscopio, se hicieron cortes precisos de alrededor de 2 mm, se volvieron a desinfectar durante 15 s en una solución de hipoclorito al 1%, se colocaron en placas de Petri con medio de cultivo PDA, y se incubaron a una temperatura de 27±2 °C durante siete días.

Aislados monospóricos

Para obtener cultivos puros a partir de esporas, se utilizó la técnica descrita por Covacevich y Consolo (2014), con un popote estéril se tomó un disco de micelio, el cual se transfirió a 10 mL de agua destilada estéril y se agitó en un vortex, hasta obtener una suspensión homogénea. Luego, se realizaron diluciones en agua destilada estéril hasta alcanzar una concentración de 1×10^8 conidios/mL de la cepa. Para el conteo de esporas se utilizó un microscopio compuesto (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Alemania) de campo claro a 100x y una cámara de Neubauer. Posterior, se tomaron 200 µL de suspensión de conidios y se depositaron en medio de cultivo PDA en cajas de Petri, estas fueron incubadas en una estufa marca Felisa® a una temperatura de 27±2 °C. Después de 24 h, se revisó la germinación de los conidios con apoyo de un microscopio estereoscópico dentro de una campana de flujo. Una vez que germinaron, se procedió a colocar fragmentos del medio de cultivo de conidios con una aguja entomológica esterilizada, estos fragmentos fueron transferidos a cajas de Petri individuales con medio PDA y así se lograron obtener cultivos puros a partir de esporas individuales.

Establecimiento de cepas fúngicas entomopatógenas y liberación de ninfas de *D. citri*

Para llevar a cabo los postulados de Koch, se utilizó un invernadero con dimensiones de 20 m de largo por 12 m de ancho, con cubierta plástica de hule blanco lechoso del 30% de sombra y difusión lumínica del 70%, temperatura media de 28 °C a medio día y un promedio de humedad relativa del 80%, se hicieron siete jaulas con malla mosquitera sujeta a una estructura de madera de 3 cm de espesor, cada jaula media 120 cm de alto por 60 cm ancho. Por separado en una maceta de plástico de 60 L se colocó suelo estéril y se trasplantó una planta de lima persa de un año, provenientes de viveros certificados. El arreglo

experimental fue lineal a una distancia de 50 cm entre cada jaula, se procedió a colocar las macetas dentro de ellas, en cada extremo se colocó un control sin cepas fúngicas, las cinco contiguas se les aplicó la suspensión de conidios de cultivos monospóricos de 20 d de ser sembradas. Para el conteo de conidios, se utilizó un microscopio compuesto con una cámara de Neubauer y se prepararon diluciones seriadas hasta obtener una concentración de 1×10^8 conidios/mL. A cada planta de lima persa, se le aplicó un volumen de 600 mL de suspensión de manera directa a la base del tallo para inundar las raíces, adicional se hicieron tres aplicaciones con intervalos de 15 d. Para reforzar el establecimiento de las cepas entomopatógenas en las plantas, se volvieron a inocular a los 45 d con la misma cantidad de suspensión, se tomaron muestras de tejido vegetal de ramas, nervaduras centrales y tallo. Las muestras fueron utilizadas para el reaislamiento de las cepas fúngicas, para verificar que las especies de hongos aislados fueran las mismas que se inocularon en las plantas de lima persa. Para comprobar si las cepas tenían comportamiento endófito, dentro de cada jaula experimental se liberaron 100 ninfas del psílido asiático en estadio dos en los brotes tiernos de cada planta de lima persa, se observaron por 40 d para ver el desarrollo del ciclo biológico de los insectos, el comportamiento y la presencia de las cepas fúngicas como colonizadoras de *D. citri*.

Identificación morfológica y morfométrica de las cepas fúngicas

Para caracterizar los hongos, se realizaron observaciones morfológicas y medidas morfométricas detalladas de estructuras como conidios, micelio, forma de la colonia y color. Las muestras de conidios y micelio fueron montadas en portaobjetos con una gota de azul de lactofenol y observadas con un microscopio compuesto. La identificación se llevó a cabo mediante la comparación de las estructuras reproductivas con las claves taxonómicas (De Hoog, 1972; Humber, 2012).

Caracterización molecular de hongos entomopatógenos

En la caracterización molecular se extrajo ADN de micelio joven de dos semanas, de cepas sembradas en medio de cultivo PDA. Este proceso se realizó con el Kit de extracción ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ y las instrucciones del fabricante. A continuación, se evaluó la concentración y calidad del ADN con un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (ThermoScientific, Wilmington, DE). Para el análisis molecular de las cepas fúngicas, se amplificó la región ITS, rRNA con los iniciadores ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG 3') e ITS4 (5'TCC

TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L, que incluyó 1X de buffer de PCR, 3 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.4 pM de cada iniciador ITS1 e ITS4, 2.5 U de Taq Polimerasa (GoTaqFlexi, Promega), agua libre de nucleasas grado molecular (31.5 μ L) y 50 ng de ADN total. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes, una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, 34 ciclos a 95 °C por 45 s, 53 °C por 30 s y 72 °C por 90 s y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación obtenidos por PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.8% a 90 V en buffer TBE 0.5X, se utilizó una cámara horizontal BIO-RAD Powerpac Basic. Para la carga en el gel, se mezclaron 3 μ L de solución buffer de carga (Buffer 5X, Green Gotaq, marca PROMEGA) con 7 μ L del producto de amplificación. Se manejó un marcador de peso molecular para ADN de 100 bp (Promega) como referencia durante la electroforesis, y se enviaron los amplificadores a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT).

RESULTADOS

Las especies de hongos entomopatógenos identificadas por morfología taxonómica de las estructuras reproductivas y comparadas con las secuencias reportadas en el Gen Bank fueron *Acrodontium crateriforme* (Ascomycota: Teratosphaeriaceae) con número de accesoión FN666568 se obtuvo un 99.3% de identidad, *Hirsutella citrififormis* (Ascomycota: Cordycipitaceae) con accesoión KJ958989 fue del 98.6% de identidad, *Isaria fumosorosea* (Ascomycota: Cordycipitaceae) con número de accesoión LY490786 con un 99.2% de identidad, *Metharizium anisopliae* (Ascomycota: Clavicipitaceae) con accesoión AF487272 dio 100% de identidad y *Trichoderma harzanium* (Ascomycota: Hypocreaceae) con número de accesoión FG342172 fue del 100% de identidad.

La especie *A. crateriforme* se identificó miconizando de manera natural a adultos de *D. citri*, en el experimento en invernadero se demostró su comportamiento como hongo entomopatógeno endófito. En la figura 1 compuesta se describe su morfotaxonomía, en la Fig. 1A inicia con estípites rígidos compactos alargados de color gris claro, al madurar se matizan de marrón claro y sobresalen en la parte ventral del insecto, Fig. 1B y C estípites alargados con la parte apical redondeada, en la Fig. 1D se elaboró un medio específico de cultivo agar-extracto vegetal de limón persa donde creció la colonia de color verde gris, y formaron aglomerados miceliales afelpados a los siete días de sembrado, en la Fig. 1E se ilustra conidióforos alargados y ensanchados en la parte basal, en la parte media se

estrechan y terminan en la parte apical puntiaguda, en la Fig. 1F y G los conidios son hialinos con apariencia lisa, ovalados y puntiaguda en la parte basal con promedio de 7 μm de largo por 4 μm de ancho, semejantes con el género *Acrodontium* (De Hoog, 1972).

En la figura 2A se ilustra en la parte lateral del protórax y mesotórax de adulto de *D. citri* micelio de color gris claro, en la Fig. 2B micelio de color rosa polvo ligeramente afelpado micelio y crecimiento radial abundante, en la Fig. 2C se observa las características del sinema de color marrón envuelto

en una capa mucilaginosa, donde se insertan las fiálides con conidios diminutos y terminan en punta (Humber, 2012).

En la figura 3A se observa un psílido asiático miconizado, al inicio en tono blanco con iridiscencia de color rosado, en la Fig. 3B conidios y micelio maduro afelpado de color gris oscuro, en la Fig. 3C conidióforos individuales, agrupados, con paredes lisas y hialinas con verticilos ramificados en grupos de tres fiálides, los conidios con morfología cilíndrica a fusiforme, formaron estructuras en cadenas (Domsch *et al.*, 1980).

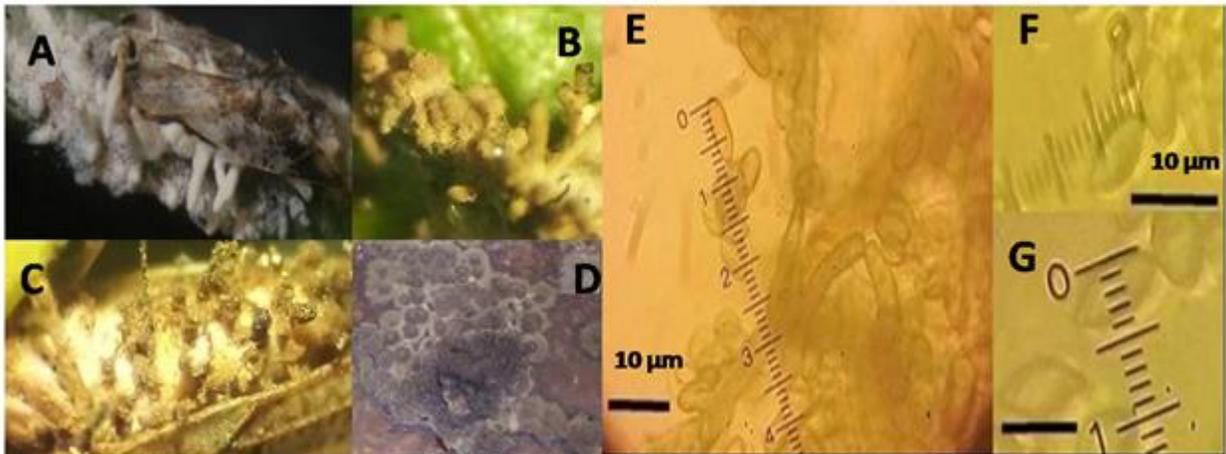


Figura 1. A) *Acrodontium crateriforme* en adulto de *D. citri* B) Estípites, C) Estípites maduros, D) Forma de la colonias y color, E) Conidióforos alargados. F y G) Conidios de forma ovalada de 7 μm de largo y 4 μm de ancho, tomada con el ocular 100x. Fotografías Mahatma Gandhi Landa Cadena.

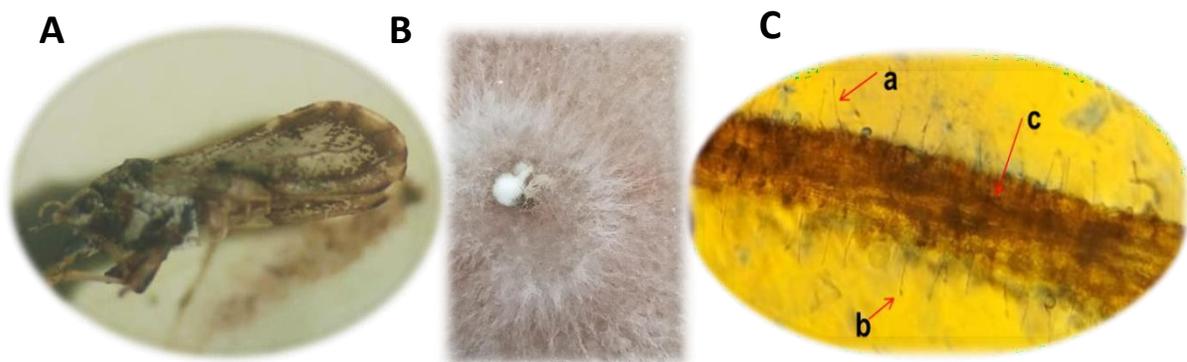


Figura 2. A) *Hirsutella citrififormis* en psílido asiático, B) Cepa aislada en PDA. C) Sinema (a) Fiálides, (b) Conidio diminutos y puntiagudos (c) Sinema envuelto en una capa mucilaginosa, tomada con el ocular 100x. Fotografías Mahatma Gandhi Landa Cadena.

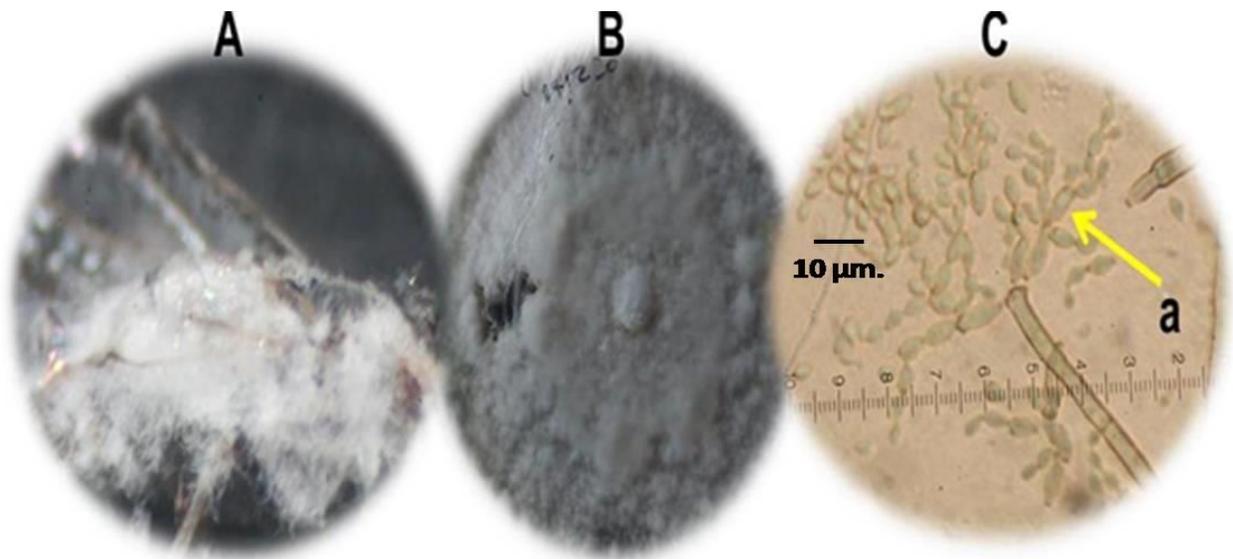


Figura 3. A) *Isaria fumosorosea* en adulto *D. citri*. B) Colonia de la cepa fúngica en PDA. C) Forma de conidios, tomada con el ocular 100x. Fotografías Mahatma Gandhi Landa Cadena.

En la Fig. 4A se ilustra la colonia micelial de la cepa *M. anisopliae* de color gris tornándose a marrón oscuro, en la Fig. 4B la colonia de color marrón claro y en la Fig. 4C conidios con medidas morfométricas de $5.97 \mu\text{m} \pm 0.08 \mu\text{m}$ largo y $3.60 \pm 0.06 \mu\text{m}$ de ancho. En este estudio, la morfología de las colonias y la morfometría de los conidios coincidieron con las características descritas (Alcántara-Vargas *et al.*, 2020).

En el diagrama de la figura 5, se esquematizan los pasos del método de inundación directa en tallo y

sistema radicular, con una suspensión de conidios y micelio de hongos entomopatógenos endófitos, al completar el ciclo biológico del insecto vector desarrollaron un comportamiento lento y una actividad reducida, permanecieron sobre las nervaduras centrales de las hojas maduras y en los tallos más gruesos de la planta. El porcentaje de mortalidad de la población de los psíidos asiáticos adultos, en orden descendente fue *A. crateriforme* con un 90%, *M. anisopliae* un 85%, *H. citrifomis* 68%, *I. fumosorosea* colonizó el 65% y *T. harzianum* un 50%.

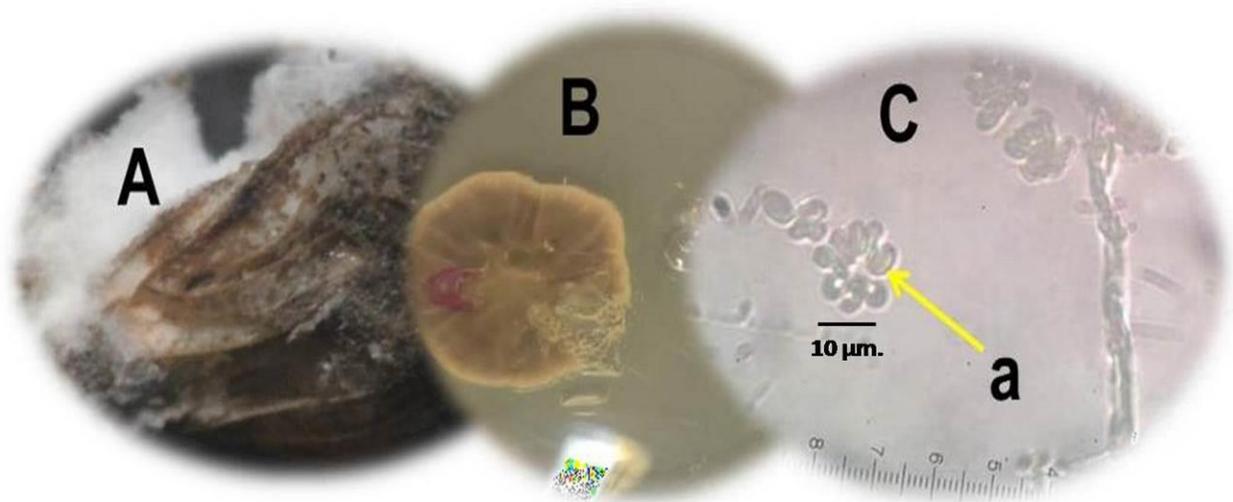


Figura 4. A) *Metharizium anisopliae* en adulto de psílido asiático miconizado, B) Colonia en PDA y C) Conidios ovalados, tomada con el ocular 100x. Fotografías Mahatma Gandhi Landa Cadena.

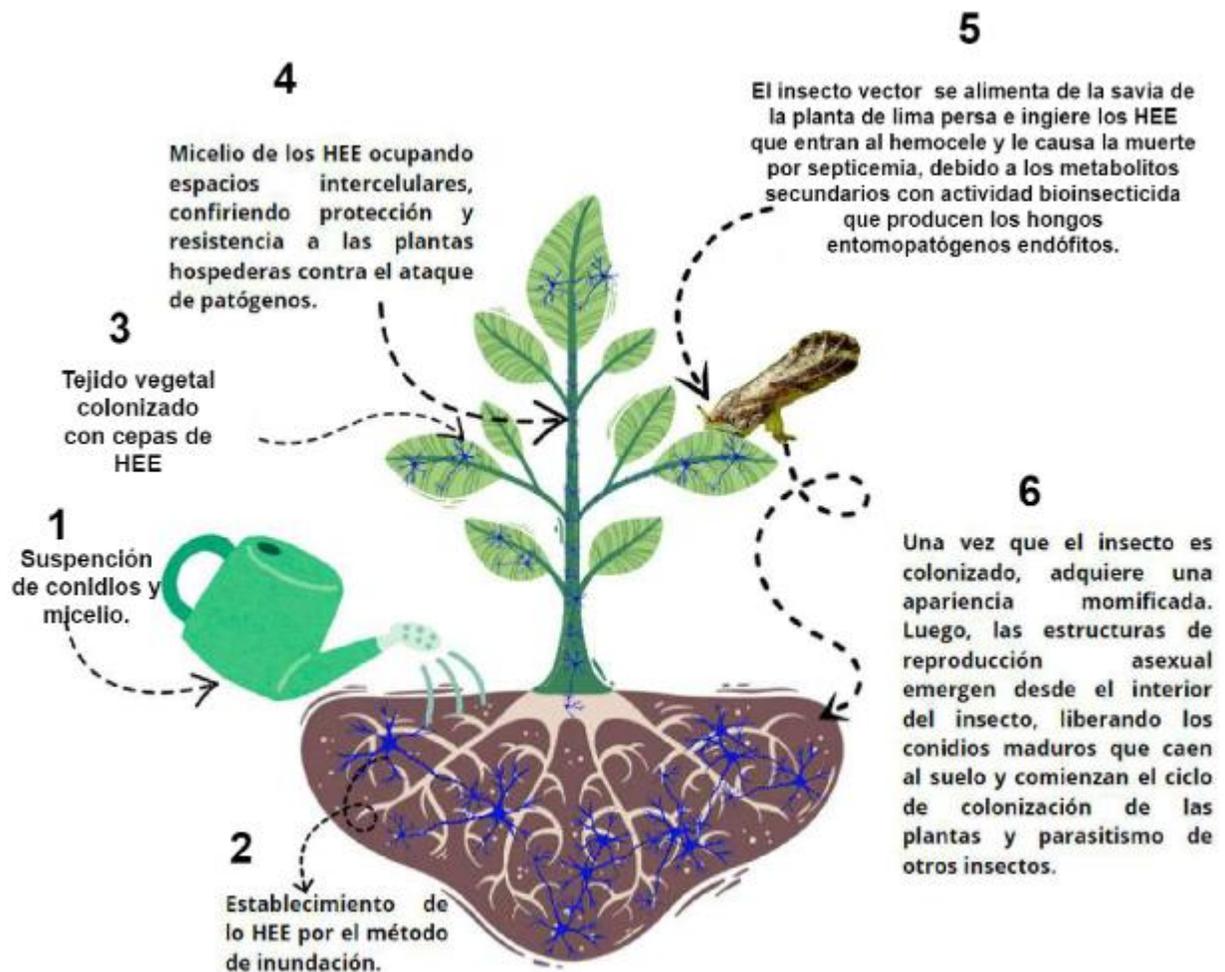


Figura 5. Diagrama de inoculación por inundación de los hongos entomopatógenos endófitos (HEE) en la base de la raíz de la planta. Esquema elaborado por Mahatma Gandhi Landa Cadena.

DISCUSIÓN

Las cepas evaluadas de hongos entomopatógenos actuaron como endófitos en árboles de lima persa al ser inoculadas por el método de inundación directa, todos los HEE se reaislaron y coincidieron con las aisladas de las muestras de campo. Para el caso *A. crateriforme* se ha descrito en la literatura como cosmopolita con asociaciones complejas de huésped-hongo, por ejemplo, en Florida, Estados Unidos de América alrededor del lago Lake Alice encontraron arañas del género *Trachelas* miconizadas por *A. crateriforme* (Joseph *et al.*, 2024). Esto refuerza que el hongo entomopatógeno *A. crateriforme* posee la capacidad de miconizar en la naturaleza a otros organismos, como sucedió en este estudio en adultos *D. citri* con micosis en huertos de lima persa en el norte de Veracruz, México. Además, es una especie de hongo con extensa distribución geográfica y hospederos diversos, de acuerdo con Jae-Wook *et al.*

(2022) la reportaron en Corea en acículas de *Pinus densiflora* y *Juniperus rigida*, en Taiwán la identificaron en huertos de plátano en hojas (Chun-Hao, 2017), en noreste de la India en plantas carnívoras (Sun *et al.*, 2024; Prabhugaonkar y Pratibha, 2017).

Existen en Argentina evaluaciones de campo de *D. citri* en donde se obtuvo una mortandad con los siguientes hongos entomopatógenos *M. anisopliae* (63%), *I. javanica* (82%) *B. bassiana* (82%) en ninfas y adultos (Augier *et al.*, 2023). En México El Centro Nacional de Referencia perteneciente al SENASICA evaluaron en laboratorio tres cepas fúngicas de *I. fumosorosea* y una de *M. anisopliae* aisladas de hemípteros, y concluyeron que son candidatas para usarlas en el control biológico de *D. citri*, debido al alto porcentaje de mortandad que fue del 93 al 100% en ninfas y 95% en adultos (Mellín-Rosas y Arredondo-Bernal, 2011). En contraste Lezama-

Gutiérrez *et al.* (2011) obtuvieron en laboratorio mortandad de ninfas y adultos con las cepas *H. citriformis* (60%), *I. fumosorosea* (40%) y *M. anisopliae* (50%). Existe discrepancia con la evaluación en condiciones de invernadero de este estudio, debido a que las cepas *A. crateriforme*, *M. anisopliae*, *H. citriformis*, *I. fumosorosea* y *T. harzianum* solo miconizaron y mataron al psílido asiático en etapa adulta, esto puede deberse al método que se usó y que fue por inundación directa de conidios en la base del tallo y raíces, porque el hongo tarda más tiempo en establecerse en la planta como endófito, que por aspersión directa al insecto plaga en laboratorio y en el caso de aplicaciones foliares en campo; interfieren factores como la temperatura, la humedad relativa y los coadyuvantes que se utilizan en la suspensión de los conidios, por lo que no se tiene claro la efectividad de los hongos entomopatógenos (Augier *et al.*, 2023). Además, por el método de aspersión directa al follaje los hongos entomopatógenos no pueden actuar como endófitos, y lo que se busca con el método de inundación directa en la base del tallo y raíces es fortalecer el sistema inmune de la planta de lima persa, desde vivero hasta ser sembrada en campo y así poder generar resistencia sistémica inducida al ataque del vector *D. citri*.

En Colombia aislaron la cepa de *Trichoderma* sp. en adultos micronizados de *D. citri*, y la evaluaron de forma *in vitro* y obtuvieron una mortandad del (82%) en adultos (Gómez-Hurtado, 2022). En este trabajo ya se encontró de manera natural miconizando al insecto y se evaluó en invernadero con resultados aceptables del 50% de mortandad. A diferencia de las cepas *M. anisopliae*, *I. fumosorosea*, *H. citriformis* ya fueron aisladas y evaluadas en ninfas y adultos de *D. citri* en México, la diferencia fue el método de aplicación. Asimismo, se indica que los hongos entomopatógenos endófitos mantienen una asociación directa con la planta huésped, debido a las ventajas que ofrecen como crecimiento y biocontrol de patógenos, los hongos al vivir como saprófitos facultativos, poseen la capacidad de ser endófitos y pueden desarrollar dos funciones, el ataque a los insectos plagas y dar protección a la planta hospedera (Mantzoukas y Eliopoulos, 2020; Sui *et al.*, 2023; Zheng *et al.*, 2023).

Un aspecto a considerar para obtener resultados positivos con el uso de entomopatógenos, es la obtención de cepas nativas, con lo que se asegura mayor efectividad patogénica, debido a que ya están adaptadas a las condiciones ambientales de una región específica; al introducir cepas patógenas de otras zonas geográficas, existe riesgo de que no se adapten y que los resultados no sean los esperados (García-García *et al.*, 2014). De acuerdo con Wakil *et al.* (2024), las diferencias de colonización entre las

cepas fúngicas pueden deberse a variaciones fisiológicas de los órganos de las plantas hospederas y la capacidad específica de adaptación de entomopatógeno. En este estudio los hongos entomopatógenos endófitos *A. crateriforme*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea*, *H. citriformis* y *T. harzianum* evaluadas en invernadero, sí ofrecieron protección eficiente ante la presencia del psílido asiático, debido a que las cinco cepas identificadas lograron colonizar todas las plantas de lima persa que fueron inoculadas y en los dos controles no se observaron cambios. Al detectar la presencia de los hongos entomopatógenos endófitos, las plantas desencadenan respuestas defensivas bioquímicas a otros fitopatógenos, estas incluyen la producción de compuestos como ácido salicílico y ácido jasmónico, fitohormonas que activan respuestas de defensa y regulan la producción de metabolitos secundarios, además sintetizan fitoalexinas con propiedades antimicrobianas, fenoles y flavonoides, que reducen el estrés oxidativo, a su vez las plantas emiten compuestos volátiles que le comunican a otras plantas vecinas del mismo cultivo, por medio de estímulos externos que activen sus mecanismos de defensas ante los patógenos (Jones y Dangl, 2006).

CONCLUSIÓN

Se identificaron los hongos entomopatógenos endófitos *A. crateriforme*, *M. anisopliae*, *H. citriformis*, *I. fumosorosea* y *T. harzianum* en huertos de lima persa en Veracruz, no existen registros de la cepa *A. crateriforme* miconizando de forma natural a *D. citri* en México. Se demostró en condiciones de invernadero que las cinco cepas colonizaron plantas de lima persa y momificaron al psílido de los cítricos: *A. crateriforme* con 90%, *M. anisopliae* 85% y *H. citriformis* 68%, *I. fumosorosea* colonizó el 65% y *T. harzianum* un 50%, por lo tanto, sí poseen potencial como agentes de control biológico por el método de inundación directa en la base del tallo y raíces; de esta forma las cepas se comportaron como endófitas, al establecerse en el sistema vascular de la planta, se minimizó el riesgo de pérdida de viabilidad de la suspensión de conidios. Se plantea realizar ensayos en vivero certificados con las cepas más virulentas para implementarlas como una nueva estrategia en el manejo integrado de plagas (MIP) en campo, y así disminuir la incidencia del HLB en los árboles de cítricos. Además, se deben hacer pruebas para conocer si no existen efectos negativos en los insectos benéficos.

Acknowledgements

To the Applied Mycology Research Center, of the Universidad Veracruzana, for the use of its facilities and equipment. To CONAHCYT for the scholarship awarded.

Funding. Nothing to declare.

Conflict of Interest. None.

Compliance with ethical standards. Do not apply.

Data availability. Data are available with Alejandro Salinas Castro (asalinas@uv.mx).

Author contribution statement (CRediT). **M.G. Landa-Cadena:** investigation, methodology, funding acquisition, molecular identification of fungi, and writing-original draft. **A. Trigos:** writing-review, supervisión and resources. **F. Hernández-Rosas:** writing-review, supervisión and resources. **A. Salinas-Castro:** conceptualization, investigation, methodology, identify morphotaxonomic fungi, molecular identification of fungi, supervision, resources, writing-original draft and writing-review.

REFERENCES

- Alcántara-Vargas, E., Espitia-López, J., Garza-López, P.M. and Ángel-Cuapio, A., 2020. Producción y calidad de conidios de cepas de entomopatógenos del género *Metarhizium anisopliae*, aislados en zonas agrícolas del Estado de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 91, pp. 1-11. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.2912>
- Augier, L., Arredondo-Bernal, H. C., Pérez, D., Martínez, D., Lizondo, M., Mellín-Rosas, M. A., del P. Pérez, M.L. and Gastaminza, G., 2023. Respuesta de *Diaphorina citri* Kuwayama a Cepas de Hongos Entomopatógenos en Argentina. *Southwestern Entomologist*, 48 (1), pp. 179-188. <https://doi.org/10.3958/059.048.0117>
- Aragón, S.M. and Beltrán-Acosta, C., 2018. Los hongos endófitos en control biológico de fitopatógenos e insectos plaga. In: A.M. Cortes Padro. *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros (Vol. 2). Aplicaciones y perspectivas*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), pp. 850-877.
- Berlanga-Padilla, A.M., Gallou, A., Ayala-Zermeño, M.A., Serna-Domínguez, M.G., Montesinos-Matías, R., Rodríguez-Rodríguez, J.C. and Arredondo-Bernal, H. C., 2018. Hongos entomopatógenos asociados a *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en Colima, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89, pp. 986-1001. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2018.4.2334>
- Chun-Hao, C., 2017. Fungi on banana in northern Taiwan. Thesis MSc. National Central University, p. 113. http://ir.lib.ncu.edu.tw:88/thesis/view_etd.asp?URN=103821023103821023
- Covacevich, F. and Consolo, V.F., 2014. Manual de protocolos, herramientas para el estudio y manipulación de hongos micorrícicos arbusculares y *Trichoderma*. 1ª ed. Mar del Plata, Empresa de Bio Tecnología.
- DE Hoog, G.S., 1972. Studies in Mycology No.1, the genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov, Paises bajos. Editorial Board.
- Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.H., 1980. Compendium of soil fungi. Vol 2. Universidad de Michigan, Academic Press.
- Ferron, P., 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*, 23, pp. 409-442. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.23.010178.002205>
- García-García, M. A., Cappello-García, S., Leshner-Gordillo, J. M. and Molina-Martínez, R. F., 2014. Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte Sanitario*, 10(2), pp. 21-28. <https://doi.org/10.19136/hs.a10n2.229>
- Gómez-Hurtado, K. D., 2022. Evaluación de la susceptibilidad de *Diaphorina citri* Kuwayama insecto vector del HLB frente a cepas fúngicas con potencial entomopatógeno en condiciones *in vitro*. Tesis, *Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agropecuarias*, Universidad de Santander, Colombia, pp. 1-84.
- Hodges, A.W. and Spreen, T.H., 2011. Economic impacts of citrus greening (HLB) in Florida, 2006/07–2010/11. *University of Florida*, pp 1-6. <https://crec.ifas.ufl.edu/media/crecifasufledu/extension/plant-pathology-greening/pdf/FE90300.pdf>

- Humber, R.A., 2012. Identification of entomopathogenic fungi. In: L.A. Lacey. 2th. *Manual of techniques in insect pathology*, 2th. Londres: Academic Press. pp. 151-187. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00006-3>
- Jae-Wook, C., Jung-Min, L., Seok-Yong, P. and Ahn-Heum, E., 2022. *Acrodontium burrowsianum* and *Pestalotiopsis humicola*: two reviously unrecorded fungal species isolated from conifer leaves in Korea. *The Korean Journal of Mycology*, 50(4), pp. 311-318. <https://doi.org/10.4489/KJM.20220033>
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature*, 444, pp. 323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Joseph, R.A., Masoudi, A., Valdiviezo, M.J., Keyhani, N.O., 2024. Discovery of *Gibellula floridensis* from Infected spiders and analysis of the surrounding fungal entomopathogen community. *Journal of fungi*, 10, pp. 694. <https://doi.org/10.20944/preprints202409.0736.v1>
- Karthi, S., Vasantha-Srinivasan, P., Senthil-Nathan, S., Soo-Han, Y., Subramanian-Shivakumar, M., Murali-Baskaran, R.K., Kalaivani, K., Radhakrishnan, N. Park, K.B. and Malafaia, G., 2024. Entomopathogenic fungi promising biocontrol agents for managing lepidopteran pests: review of current knowledge, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 58, pp. 103146. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103146>
- Lezama-Gutiérrez, R., Galván-Gutiérrez, G., Contreras-Bermúdez, Y., Díaz-Flores, S., Reyes-Martínez, G., Barba-Reynoso, M. *et al.*, 2011. Presencia natural y patogenicidad de los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Cordyceps bassiana* (Ascomycetes) en ninfas y adultos de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) en el estado de Colima. In: M. Elías-Santos, K. Arévalo-Niño, I. Quintero-Zapata, C. Solís-Rojas, C. F Sandoval-Coronado, H. A. Luna-Olvera *et al.* (Eds.), *Memorias del XXXIV Congreso Nacional de Control Biológico*, pp. 90-96.
- Mantzoukas, S. and Eliopoulos, P.A., 2020. Endophytic entomopathogenic fungi: a valuable biological control tool against plant pests. *Applied Sciences*, 10, pp. 1-13. <https://doi.org/10.3390/app10010360>
- Mellín-Rosas, M.A. and Arredondo-Bernal, H.C., 2011. Generación de tecnología para el manejo de *Diaphorina citri* mediante el uso de hongos entomopatógenos. In: H.C. Arredondo-Bernal., J.A. Sánchez-González, and Mellín-Rosas, M.A. Taller Subregional de Control Biológico de *Diaphorina citri*, vector del HLB. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, *CNRF-DGSVSENASICA-SAGARPA*, pp. 55-57. <https://www.fao.org/4/as132s/as132s.pdf>
- Moore, D., Bateman, R.P., Carey, M. and Prior, C., 1995. Long-term storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology*, 5(2), pp. 193-200. <https://doi.org/10.1080/09583159550039918>
- Ortiz-Espinoza, E., Villegas-Rodríguez, F., Ramírez-Tobías, H.M., Hernández-Arteaga, L.E. Del S. and Marín-Sánchez, J., 2020. La inoculación con hongos endófitos entomopatógenos en semilla genera una respuesta fisiológica y promueve el crecimiento vegetal en plantas de chile poblano en invernadero. *Nova scientia*, 12(25), pp.1-27. <https://doi.org/10.21640/ns.v12i25.2586>
- Pérez-González, O., Rodríguez-Villarreal R. A., López-Arroyo, J.I., Maldonado-Blanco, M. G. and Rodríguez-Guerra, R., 2015. Mexican strains of *Hirsutella isolated* from *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae): morphologic and molecular characterization. *Florida Entomologist*, 98(1), pp. 290-297. <https://doi.org/10.1653/024.098.0147>
- Prabhugaonkar, A. and Pratibha, J., 2017. Isolation of *Acrodontium crateriforme* as a pitcher trap inquiline. *Current Research in Environmental & Applied Mycology Journal of Fungal Biology*, 7(3), pp. 203-207. <https://doi.org/10.5943/cream/7/3/7>
- Rubel, F. and Kottek, M., 2010. Observed and projected climate shifts 1901-2100 depicted by world maps of the Köppen-Geiger climate classification. *Meteorologische Zeitschrift*, 19 (2), pp. 135-141. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2010/0430>
- Sahayaraj, K. and Namasivayam, S.K.R., 2008. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products y byproducts. *African*

- Journal of Biotechnology*, 7(12), pp. 1907-1910. <https://doi.org/10.5897/AJB07.778>
- Sánchez-Peña., S.R., Juan-Lara, J.S. and Medina, R.F., 2011. Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, México, and their virulence towards thrips and whiteflies. *Journal of insect science*, 11(1), pp. 1-10. <https://doi.org/10.1673/031.011.0101>
- SIAP., 2023. Anuario estadístico de la producción agrícola 2022. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://nube.siap.gob.mx/cierreagricola>
- Sun, P.F., Lu, M.R., Liu, Y.C., Shaw, B.J.P., Lin, C.P., Chen, H.W., Lin, Y.F., Hoh, D.Z., Ke, H.M., Wang, I.F., Lu, M.J., Young, E.B., Millett, J., Kirschner, R., Lin, Y.J., Chen, Y.L. and Tsai, I.J., 2024. An acidophilic fungus promotes prey digestion in a carnivorous plant. *Nature Microbiology*, 9(10), pp. 2522-2537. <https://doi.org/10.1038/s41564-024-01766-y>
- Sui, L., Yang, L., Zhou, L., Li, N., Li, Q. and Zhang, Z., 2023. Endophytic *Beauveria bassiana* promotes plant biomass growth and suppresses pathogen damage by directional recruitment. *Frontiers in Microbiology*, 14, pp. 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1227269>
- Wakil, W., Boukouvala, M.C., Kavallieratos, N.G., Naeem, A., Ghazanfar, M.U. and Alhewairini, S.S., 2024. Impact of three entomopathogenic fungal isolates on the growth of tomato plants-ectoapplication to explore their effect on *Tetranychus urticae*. *Agronomy*, 14(4), pp. 1-16. <https://doi.org/10.3390/agronomy14040665>
- Zheng, Y., Liu, Y., Zhang, J., Liu, X., Ju, Z., Shi, H., Mendoza-Mendoza, A. and Zhou, W., 2023. Dual role of endophytic entomopathogenic fungi: induce plant growth and control tomato leaf miner *Phthorimaea absoluta*. *Pest Management Science*, 79(11), pp. 4557-4568. <https://doi.org/10.1002/ps.7657>