

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE
Hirsutella citriformis INDUCIDAS POR EL AGENTE QUÍMICO:
METANOSULFONATO DE ETILO (EMS)**

POR

L.C.A. GEORGINA CRUZ JUÁREZ

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

DICIEMBRE, 2017

**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE *Hirsutella*
citriformis INDUCIDAS POR EL AGENTE QUÍMICO:
METANOSULFONATO DE ETILO (EMS).**

Comité de Tesis :

Dra. Ma. Guadalupe Maldonado Blanco

Directora de Tesis

Dra. Myriam Elías Santos

Secretaria

Dra. Susana de la Torre Zavala

Vocal 1

Dr. Hamlet Avilés Arnaut

Vocal 2

Dr. José María Viader Salvado

Vocal 3

**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE *Hirsutella*
citriiformis INDUCIDAS POR EL AGENTE QUÍMICO:
METANOSULFONATO DE ETILO (EMS)**

Comité de Tesis :

Dra. Ma. Guadalupe Maldonado Blanco

Directora de Tesis

Dr. Raúl Rodríguez Guerra

Asesor externo

DEDICATORIA

En este momento tal vez no entiendas esta dedicatoria pero cuando seas mayor, quiero que comprendas lo mucho que significas para mí y que me has ayudado a formarme en la mujer que soy hoy, simplemente eres el motor de mi esfuerzo.

Muchas gracias, **hijo mío Jorge Eduardo**

AGRADECIMIENTOS

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.

Al **USDA-ARS National Center for Agricultural Utilization Research**, específicamente al **Dr. Mark Jackson** por las facilidades otorgadas para la realización de bioformulaciones y sugerencias para esta investigación.

A la **Dra. María Guadalupe Maldonado Blanco, Dra. Myriam Elias Santos Dr. Raúl Rodríguez Guerra, Dr. Jose Maria Viader**, por sus aportaciones y tiempo dedicado durante este trabajo de tesis.

Al **Dr. Hamlet Avilés y Dra. Susana de la Torre** por sus ideas, tiempo y comentarios realizados que ayudaron a enriquecer este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio en especial a la **M.C Mayra Gonzalez** que su compañía aligeró este camino.

A mis compañeras en el Campo experimental de General Teran N.L **Yessi, Kensy** que fueron pacientes durante sus enseñanzas.

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

Compañeros y maestros, gracias por todo.

LUGAR DE TRABAJO



El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio **A)** L3 del Instituto de Biotecnología, FCB-UANL, **B)** Campo Experimental General Terán, Nuevo León del INIFAP y **C)** USDA-ARS National Center for Agricultural utilization research.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
LUGAR DE TRABAJO	III
TABLA DE CONTENIDO	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABLAS	VI
NOMENCLATURA	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Presencia del HLB en el mundo	3
2.2. Presencia de HLB en México	5
2.3. Daño e impacto económico	6
2.4. <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)	6
2.4.1 Ciclo de vida	7
2.4.2. Clasificación taxonómica de <i>Diaphorina citri</i>	8
2.4.3. Distribución de <i>Diaphorina citri</i>	8
2.4.4. Control del PAC	9
2.4.5. Enemigos naturales del PAC	10
2.5. Hongos entomopatógenos	10
2.5.1 <i>Hirsutella citriformis</i> sobre <i>Diaphorina citri</i>	11
2.5.2. Taxonomía <i>Hirsutella citriformis</i>	12
2.5.3. Morfología de <i>Hirsutella citriformis</i>	13
2.5.4. Producción hongos entomopatógenos	13
2.5.5. Medios de cultivo	14
2.6. Mutaciones	18
2.6.1. Metanosulfonato de etilo (EMS)	19
2.6.2. Mutagénesis en Hongos	20
2.7. Características generales de arcillas	22
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVO	23
4.1. Objetivo General	23
4.2. Objetivo Particular	23
5. JUSTIFICACIÓN	24
6. MATERIAL Y METODO	25
6.1. Obtención de las cepas de <i>Hirsutella citriformis</i>	25
6.2. Medios de cultivo para el crecimiento de <i>Hirsutella citriformis</i>	25
6.3. Resiembra y conservación de la cepa de <i>Hirsutella citriformis</i>	26
6.4. Selección de la cepa silvestre para la mutación	26
6.4.1. Tasa de crecimiento	26
6.4.2 Tiempo para producción de conidios	26
6.4.3 Cantidad de conidios	27
6.4.4 Velocidad de germinación de conidios	27

6.4.5 Análisis Estadístico	27
6.5 Verificación del número de núcleos presentes en las cepas	28
6.6 Producción de conidios en sustratos vegetales para mutagenesis	28
6.6.1 Cultivo Bifásico	28
6.6.1.1. Producción de inóculo en cultivo líquido	28
6.6.1.2. Sustratos	29
6.6.1.3. Conteo de conidios	30
6.6.1.4. Análisis Estadístico	30
6.6.2. Cultivo en arroz y avena y dos tipos de recipientes	30
6.6.2.1 Inóculo.	30
6.6.2.2 Analisis estadístico.	31
6.7. Preparación de la suspensión de conidios para la mutagénesis	31
6.8. Mutación de <i>Hirsutella citriformis</i> con el agente químico Metanosulfonato de etilo.	31
6.8.1. Preparación de la solución stock de EMS.	32
6.8.2. Pruebas con diferentes concentraciones y tiempos de exposición.	32
6.8.3. Estabilidad de las cepas.	33
6.8.4. Parametros de cepas mutantes analizadas.	33
6.9. Microcultivo	33
6.10. Bioensayos contra adultos de <i>Diaphorina citri</i>	34
6.10.1. Recipientes utilizados para el bioensayo	34
6.10.2. Obtención de insectos adultos de <i>Diaphorina citri</i>	34
6.10.3. Procedimiento de bioensayo	35
6.10.4. Analisis estadístico de bioensayo	35
6.11. Elaboración de Medios líquidos para producir biomasa y formulados secos.	35
6.11.1. Preparación de inóculo	35
6.11.2. Precultivo	36
6.11.3. Cultivos para evaluar la producción de biomasa de <i>Hirsutella citriformis</i>	36
6.11.4. Determinación de Biomasa	37
6.11.5. Evaluación de germinación	37
6.11.6. Analisis estadístico	38
6.12. Evaluación de medios con diferentes fuentes de nitrógeno	38
6.12.1. Precultivo.	38
6.12.2. Preparación de medios con diferentes fuentes de nitrógeno.	38
6.12.3. Evaluación de germinación.	39
6.12.4. Producción de conidios en la arcilla Attapulguita Georgia.	40
6.12.5. Analisis Estadístico.	40
6.12.6. Producción de conidios en diferentes tipos de arcillas.	40
7. RESULTADOS	41
7.1. Crecimiento Radial	41
7.1.1. Tasa de crecimiento radial de <i>Hirsutella citriformis</i> sobre PDA (Agar Papa Dextrosa).	41
7.1.2. Tasa de crecimiento radial de <i>Hirsutella citriformis</i> sobre PDAY al 0.5%	41

7.1.3. Comparación de la tasa de crecimiento radial	41
7.2. Producción de conidios de cepas silvestres.	42
7.3. Porcentaje de germinación de la cepa INIFAP-Hir-2	42
7.4. Verificación del número de núcleos presente en la cepa INIFAP-Hir-2	42
7.5. Selección de un sustrato	43
7.6. Selección de un sustrato y recipiente conveniente	44
7.7. Protocolo de mutación variando tiempos y concentraciones de metanosulfonato de etilo para obtención de mutantes	44
7.8. Caracterización de colonias mutantes en base a crecimiento radial, producción de conidios y velocidad de germinación	44
7.8.1. Crecimiento radial	45
7.8.2. Producción de conidios de cepas mutantes	45
7.8.3. Velocidad de germinación	45
7.9. Microcultivo	46
7.10. Bioensayo	46
7.11. Producción de biomasa de la cepa INIFAP-Hir-2 en cultivo líquido y elaboración de formulados.	47
8. DISCUSIÓN	50
9. CONCLUSIONES	62
10. PERSPECTIVAS	65
11. BIBLIOGRAFÍA	66
12. FIGURAS	87
13. TABLAS	124
14. RESUMEN BIBLIOGRAFICO	132

Figura	LISTA DE FIGURAS	Página
1.	HLB en el Mundo.	87
2.	Micrografía electrónica de barrido de los vasos del floema (Flechas). Sección transversal de una hoja, infectados experimentalmente por <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> .	87
3.	Síntomas de la enfermedad Huanglongbing. 2010.	88
4.	Distribución de Huanglongbing (HLB) en México.	88
5.	Principales productores de cítricos en el mundo	89
6.	A. Huevos de PAC en forma de balón de fútbol. B. Los cinco estados ninfales de PAC. C. Adultos y ninfas con túbulos cerosos característicos. D. Adulto <i>Diaphorina citri</i> . E. Ninfas con túbulos cerosos. F. Parte frontal de <i>Diaphorina citri</i>	89
7.	Distribución en México de <i>Diaphorina citri</i> .	90
8.	<i>Diaphorina citri</i> micosado por <i>Hirsutella citriformis</i> .	90
9.	Estructura morfológica de <i>Hirsutella citriformis</i> INIFAP-Hir- 2. A. Fiálides con su base bulbosa. B Sinema. C Conidios.	91
10.	Estructura del EMS.	91
11.	Alquilación de la Guanina.	92
12.	Arcillas granulares proporcionadas por OIL DRY corporation of America, utilizadas como soportes inorgánicos para la realización de formulados secos de <i>H. citriformis</i> .	92
13.	Unidad experimental utilizada en la realización de los bioensayos, cada recipiente contó con hule espuma humectado. A. recipiente de plástico capacidad 150mL de seis centímetros de altura y ocho centímetros diámetro superior. B. hoja de cítrico para alimento de viviidos. C. Tapa modificada (Malla para evitar salida de adultos).	93
14.	Cámara húmeda utilizada para inducir el micosamiento de insectos tratados muertos.	93

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
15.	Cámara Húmeda utilizada para secado de las formulaciones con arcillas.	94
16.	Arcilla observada bajo estereoscopio para la evaluación del porcentaje de germinación.	94
17.	Tasa de crecimiento radial (cm) de 8 cepas silvestres de <i>Hirsutella citrifomis</i> sobre PDA.	95
18.	Tasa de crecimiento radial (cm) de <i>Hirsutella citrifomis</i> silvestre sobre PDA (Agar papa dextrosa) adicionado con extracto de levadura al 0.5%.	96
19.	Comparación de tasa de crecimiento radial de cepas de <i>H. citrifomis</i> cultivadas en PDA y PDAY al 0.5 %.	97
20.	Porcentaje de germinación de <i>Hirsutella citrifomis</i> sobre cuatro diferentes medios.	97
21.	Germinación de <i>H. citrifomis</i> de Yucatán. A. Conidios en tiempo cero. B. Conidios a las 24 horas. C. conidios a las 48 horas. Vistas al microscopio de luz con el objetivo de 40X	98
22.	Verificación del número de núcleos existentes en los conidios de <i>H. citrifomis</i> . Diferentes vista al microscopio de luz con el objetivo A 100x, B 40x, C 100x y D 40x.	98
23.	Producción de conidios por cepas de <i>H. citrifomis</i> en el sustrato sorgo , a partir de un inóculo crecido en medio liquido de casaminoácidos.	99
24.	Producción de conidios por cepas de <i>H. citrifomis</i> en el sustrato avena , a partir de un inóculo crecido en casaminoácidos.	99
25.	Producción de conidios por cepas de <i>H. citrifomis</i> en el sustrato arroz , a partir de un inóculo crecido en casaminoácidos.	100

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
26.	Micelio de la cepa INIFAP-Hir-2	100
27.	Evaluación de la producción de conidios de <i>H. citriformis</i> INIFAP- Hir-2 en dos diferentes sustratos, Arroz y Avena (letras mayúsculas) bajo condiciones de laboratorio ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), utilizando dos recipientes: Vidrio y Plástico (letras minúsculas)	101
28.	Desarrollo de colonias de mutantes de <i>H. citriformis</i> después de diferentes tiempos y dosis de exposición a metanosulfonato de etilo, a los 15 días de inoculación. A 5 000 $\mu\text{l}/\text{mL}$ durante 60 minutos; B . 5 000 $\mu\text{l}/\text{mL}$ durante 180 minutos; C . 10 000 $\mu\text{l}/\text{mL}$ durante 60 minutos; D . 10 000 $\mu\text{l}/\text{mL}$ durante 180 minutos y E. Control.	102
29.	Porcentaje de supervivencia de colonias de <i>Hirsutella citriformis</i> , utilizando diferentes concentraciones y tiempos de exposición a metanosulfonato de etilo.	103
30.	Crecimiento radial de las cepas mutantes seleccionadas y cepa silvestre de <i>H. citriformis</i> INIFAP-Hir-2.	103
31.	Producción de conidios de la cepa silvestre (C) y mutantes de <i>Hirsutella citriformis</i> INIFAP-Hir-2 sobre medio PDAY posterior a 6 semanas de incubación a 25°C .	104
32A.	Crecimiento radial y producción de conidios de cepas mutantes y silvestre de <i>Hirsutella citriformis</i> INIFAP-Hir-2, sobre PDA más extracto de levadura al 1% a las seis semanas de evaluación con la dosis 10 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante tres horas. A1 . Tasa de crecimiento radial. A2 . Producción de conidios	105
32B.	Crecimiento radial y producción de conidios de cepas mutantes y silvestre de <i>Hirsutella citriformis</i> INIFAP-Hir-2, sobre PDA más extracto de levadura al 1% a las seis semanas de evaluación con la dosis 10 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante una hora B1 . Tasa de crecimiento radial. B2 . Producción de conidios	105

Figura	LISTA DE FIGURAS	Página
32C.	Crecimiento radial y producción de conidios de cepas mutantes y silvestre de <i>Hirsutella citriformis</i> INIFAP-Hir-2, sobre PDA más extracto de levadura al 1% a las seis semanas de evaluación con la dosis 5 000 µg/ml durante tres horas C1. Tasa de crecimiento radial. C2. Producción de conidios.	106
32D.	Crecimiento radial y producción de conidios de cepas mutantes y silvestre de <i>Hirsutella citriformis</i> INIFAP-Hir-2, sobre PDA más extracto de levadura al 1% a las seis semanas de evaluación con la dosis 5 000 µg/ml durante una hora D1. Tasa de crecimiento radial. D2. Producción de conidios.	106
33.	Cambios fenotípicos de mutantes de <i>Hirsutella citriformis</i> INIFAP-Hir-2 sobre PDA más extracto de levadura al 1% a las seis semanas de evaluación con la dosis 10 000 µg/ml durante tres horas.	107
34.	Cambios fenotípicos de mutantes de <i>Hirsutella citriformis</i> INIFAP-Hir-2 sobre PDA más extracto de levadura al 1% a las seis semanas de evaluación con la dosis 10 000 µg/ml durante una hora.	108
35.	Cambios fenotípicos de mutantes de <i>Hirsutella citriformis</i> INIFAP-Hir-2 sobre PDA más extracto de levadura al 1% a las seis semanas de evaluación con la dosis 5 000 µg/ml durante tres horas.	109
36.	Cambios fenotípicos de mutantes de <i>Hirsutella citriformis</i> INIFAP-Hir-2 sobre PDA más extracto de levadura al 1% a las seis semanas de evaluación con la dosis 5 000 µg/ml durante una hora.	110
37.	Formación de conidios de cepas mutantes y silvestre (control) de <i>H. citriformis</i> INIFAP-Hir-2 sobre el sustrato avena a los 21 días de incubación.	111
38.	Producción de conidios (5 repeticiones) de las cepas mutantes y silvestre de <i>Hirsutella citriformis</i> INIFAP-Hir-2 en sustrato avena a 25°C de incubación.	112

Figura	LISTA DE FIGURAS	Página
39.	Microcultivo de cepas mutante 53-10 y silvestre (control) de <i>H. citriformis</i> INIFAP-Hir-2 sobre PDAY 1% a los 15 días de incubación.	112
40.	Promedio del diámetro de los conidios (3 repeticiones) de las cepas mutantes y silvestre de <i>H. citriformis</i> INIFAP-Hir-2.	113
41.	Conidios de <i>Hirsutella citriformis</i> INIFAP-Hir-2, A. Cepa silvestre. B-D mutantes. B. 51-6 C. 53-10, D. 103-9, E. Sinema cepa silvestre, F. 101-11	114
42.	Cepa mutante 53-10 de <i>Hirsutella citriformis</i> A. Exudados sobre sinemas. B. Desarrollo de sinemas. Visto en estereoscopio 10X	115
43.	Mortalidad promedio de <i>Diaphorina citri</i> (tres repeticiones) causada por conidios de cepa silvestre y mutante (53-10) de <i>H. citriformis</i> INIFAP-Hir-2, incubados a 26±1°C, HR 76±4 % y 16:8 horas de luz: oscuridad.	116
44.	Porcentaje de adultos de <i>Diaphorina citri</i> micosados por la cepa silvestre de <i>Hirsutella citriformis</i> INIFAP-Hir-2 y mutante 53-10 a los 12 días de evaluación.	116
45.	Crecimiento de <i>Hirsutella citriformis</i> sobre adultos de <i>Diaphorina citri</i> inoculados por contacto. A. <i>D. citri</i> micosado por cepa silvestre B. Desarrollo posterior a 9 días. C y D. Desarrollo de cepa mutante 53-10.	117
46.	Producción de biomasa de la cepa <i>H. citriformis</i> INIFAP-Hir-2 Los cultivos crecieron durante 7 días en un medio de sales basales adicionado con vitaminas y trazas de metales conteniendo glucosa como fuente de carbono y caseína hidrolizada como fuente de nitrógeno.	117

Figura	LISTA DE FIGURAS	Página
47.	Viabilidad de cultivos de <i>Hirsutella citriformis</i> secados por aire sobre dos diferentes arcillas (Montmorillonita y Aluminosilicatos hidratados). A. El medio de crecimiento contenía 36g/L de glucosa y proporción C:N de 10:1. B. Con 36g/L glucosa y proporción C:N de 30:1. C. Con 36g/L glucosa y proporción C:N de 50:1.	118
48.	Producción promedio de micelio (5 repeticiones) de la cepa <i>H. citriformis</i> INIFAP-Hir-2 usando diferentes fuentes de nitrógeno posterior a 7 días de crecimiento a temperatura ambiente (25±2°C).	119
49.	Viabilidad de cultivos de <i>Hirsutella citriformis</i> secados por aire (<5% humedad) sobre la arcilla Attapulgita (GA) -325. Los cultivos crecieron durante 7 días a temperatura ambiente (25±2°C) y agitación a 300 rpm en un medio de sales basales, conteniendo glucosa como fuente de carbono (36g/L) y diferentes fuentes de nitrógeno, relación de C:N 10:1.	120
50.	Germinación micelio de <i>H. citriformis</i> INIFAP-Hir 2 sobre la arcilla Attapulgita (GA) -325 Volatilidad regular. A Caseína hidrolizada, B Harina de Algodón, C. Extracto de levadura, D Harina de Soya, E. Polvo de remojo de maíz.	121
51.	Producción de micelio de <i>H. citriformis</i> INIFAP- Hir-2 en un medio de sales basales conteniendo 36 g de glucosa como fuente de carbón y harina de soya como fuente de nitrógeno proporción de C:N de 10:1.	122
52.	Comparación de producción de conidios en diferentes arcillas a los 12 días postinoculación de la cepa INIFAP-Hir- 2, inoculadas con cultivo líquido en un medio de sales basales adicionado con vitaminas y trazas de metales y 36 g de glucosa como fuente de carbón y harina de soya como fuente de nitrógeno proporción de C:N de 10:1.	123

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Características de los estadios del liiviido asiáticos de los cítricos.	124
2. Agentes de Control Biológico utilizados contra el vector <i>Diaphorina citri</i> .	125
3. Composición porcentual promedio de cereales comunes sobre una base de peso seco.	126
4. Concentración carbón (g l ⁻¹) y proporción Carbón-Nitrógeno (C:N) en los medios líquidos usados para evaluar el crecimiento y formación de propágulos de la cepa <i>Hirsutella citriformis</i> INIFAP-Hir-2.	126
5. Arcillas utilizadas en la prueba de germinación.	127
6. Ingredientes utilizados como fuente de nitrógeno en los medios para producción de biomasa.	127
7. Arcillas utilizadas en la producción de conidios de <i>H. citriformis</i> INIFAP- Hir-2.	128
8. Producción de conidios de cepas silvestres de <i>H. citriformis</i> en medio PDA más 0.5% extracto de levadura a los 35 días de incubación a 25 ± 2°C.	129
9. Número de colonias mutantes de <i>H. citriformis</i> INIFAP-Hir-2 obtenidas después del tratamiento con metanosulfonato de etilo.	129
10. Porcentaje de germinación de conidios producidos por cepa silvestre y mutantes de <i>H. citriformis</i> INIFAP-Hir-2 crecidas en medio PDAY a 25±2°C.	130
11. Comparación de viabilidad (% germinación) de la cepa INIFAP-Hir- 2 en diferentes arcillas, inoculadas con cultivo liquido en un medio de sales basales adicionado con vitaminas y trazas de metales y 36 g de glucosa como fuente de carbón y harina de soya como fuente de nitrógeno proporción de C:N de 10:1.	131
12. Nomenclatura de Arcillas.	131

NOMENCLATURA

A	Alfa
1:1	Proporción uno a uno
2:1	Proporción dos a uno
ANOVA	Análisis de Varianza
C	Carbono
CABI	Centre for Agricultural Bioscience International.
Ca.	<i>Candidatus</i>
°C	Grados centígrados
C:N	Proporción carbono: nitrógeno
cm	Centímetro
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CaCl ₂ 2H ₂ O	Cloruro de calcio dihidratado
CaCl ₂ 6H ₂ O	Cloruro de calcio hexahidratado
CoCl ₂	Cloruro de cobalto
Esporas /mL	Esporas por mililitro
Esporas / g	Esporas por gramo
EMS	Metanosulfonato de etilo
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization.
Et al.	y colaboradores
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación
FeSO ₄	Sulfato de hierro
FeSO ₄ . 7H ₂ O	Sulfato de hierro heptahidratado
Fig.	Figura
g ⁻¹	Por gramo
g.l	Grados de libertad
g/l	Gramo (s) por litro.
HLB	Huanglongbing
HE	Hongos entomopatogeno
IARC	International Agency for Research on Cancer
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico
KCl	Cloruro de potasio
Kg.	Kilogramo.
mg	Miligramo
MgSO ₄ . 7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado
MnSO ₄	Sulfato de manganeso
MnSO ₄ . 2H ₂ O	Sulfato de manganeso dihidratado
mL	Mililitro
N	Nitrógeno
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio
NaNO ₄	Nitrato de sodio
µl	Microlitros

PAC	Psilido asiático de los cítricos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar papa dextrosa
PDAY	Agar papa dextrosa más extracto de levadura
PH	Potencial de Hidrogeno
RDNA	Acido desoxirribonucleico recombinante
RPM	revoluciones por minuto
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
UV	Luz ultravioleta
µm	Micrometros
α; 0.05	Error de 0.05
ZnSO ₄	Sulfato de Zinc
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	Sulfato de Zinc heptahidratado

RESUMEN

Hirsutella citriformis es un hongo entomopatógeno que tiene potencial para desarrollarse como agente de control del liviido *Diaphorina citri* Kuwayama, vector de la enfermedad más devastadora conocida como Huanglongbing (HLB) ya que causa la muerte productiva de las plantas cítricas, una vez infectadas. Sin embargo, el hongo tiene un lento crecimiento y reducida producción de conidios. Se tiene la hipótesis que la mutagénesis al azar resultaría en un mejoramiento de tales las características. Por lo cual en el presente trabajo se evaluaron 8 cepas de *Hirsutella citriformis* para conocer sus características de producción de conidios, velocidad de germinación y crecimiento radial. También se verificó el número de núcleos presentes en la cepa INIFAP-Hir-2 con la finalidad de elegir una cepa candidata para el mejoramiento genético. Se evaluaron técnicas como el cultivo bifásico en diferentes sustratos de bajo costo (sorgo, arroz y avena) para obtener la mayor producción de conidios que serían utilizados en la mutagenesis clásica con el agente químico metanosulfonato de etilo (EMS) el cual ha sido exitosamente usado para introducir cambios de una sola base en el ADN, se estableció un protocolo de mutación variando tiempos y concentraciones para la obtención de cepas mutantes, se caracterizaron las cepas mutantes obtenidas en base a crecimiento radial, producción de conidios y velocidad de germinación en medio PDA con extracto de levadura. Se realizó la técnica de microcultivo para conocer la estructura fúngica de las cepas seleccionadas, se llevaron a cabo bioensayos por contacto contra liviidos de *Diaphorina citri* para determinar mortalidad. Por otra parte se evaluaron 6 medios líquidos con diferentes concentraciones de carbón y diferentes proporciones de Carbón-Nitrógeno utilizando fuentes de nitrógeno de bajo costo para obtener una alta producción de biomasa y elaborar formulados secos utilizando como soporte 9 diferentes arcillas. Dentro de los resultados obtenidos, el análisis estadístico determinó que las cepas INIFAP-Hir-2, IB-Hir-1 e INIFAP-Hir-5 presentaron significativamente la mayor tasa de crecimiento radial, mostrando valores de 3.63, 3.67 y 3.60 cm respectivamente, a los 50 días en PDA. La tasa de crecimiento radial varió de 0.057 cm /día (IB-Hir-2) a 0.073 cm /día (INIFAP-Hir-2) en medio PDA, mientras que en medio PDAY al 0.5% varió de 0.084 (INIFAP-Hir-4) a 0.1cm/día (INIFAP-Hir-2, INIFAP-Hir-6). A las 5 semanas de incubación se observó que la cepa INIFAP-Hir-2 presentó la mayor producción de conidios y difirió significativamente del resto de las cepas. La cepa INIFAP-Hir-2 a las 48 horas alcanzó 95% de germinación en el medio PDA y se identificó como mononucleada. En la producción de cultivo bifásico, la mayor concentración de conidios se obtuvo con la cepa IB-Hir-2 con el sustrato avena con 9.33×10^6 conidios g^{-1} siguiéndole INIFAP-Hir-2 con 8.58×10^6 , no existiendo diferencia significativa entre los dos valores. La cepa INIFAP-Hir-2 fue la seleccionada para mutación en base a sus características de producción de conidios y tasa de crecimiento radial. En experimentos de producción de conidios en avena y arroz, la avena promovió significativamente mayor producción de conidios que el arroz, y en cuanto al recipiente, fue mejor el de plástico que el vidrio, con una producción de 52.76×10^6 conidios/g a los 28 días. Respecto a la mutagénesis, la selección fue en base a su supervivencia, obteniéndose un total de 63 colonias. Las mutantes mostraron fenotipos diversos así como variaciones en las características morfológicas. Las cepas 103-15, 103-17, 101-19, 101-21, 101-23 y 51-11 mostraron diferencias significativas respecto a la mutante 53-10

y al control. La cepa 53-10 produjo 7.61×10^6 conidios/ml por lo cual mostró diferencia significativa respecto a la cepa silvestre con una producción de 3.05×10^6 conidios/ml a las seis semanas de incubación en caja Petri en medio de cultivo PDAY 1%. En cuanto a los resultados de velocidad de germinación, a las 24 horas se observó que la cepa mutante 53-10 mostró diferencia significativa respecto a las tres cepas mutadas restantes y diferencia parcial respecto a la cepa silvestre. Las cepas mutantes que produjeron mayor número de conidios sobre agar fueron posteriormente evaluadas en el sustrato avena. A los 14 días se observó diferencia significativa en la producción de conidios entre la cepa mutante 53-10 que presentó 1.95×10^6 conidios/ml respecto a la cepa silvestre (1.36×10^6 conidios/ml). Cuando se realizaron microcultivos, se encontró diferencia significativa en el diámetro de los conidios formados por las cepas mutantes 101-11, 53-10 y 51-6 respecto a la cepa silvestre y la cepa 103-9. Los resultados obtenidos en el bioensayo, al noveno día en nuestro estudio mostró 84% y 98% de mortalidad para la cepa silvestre y mutante 53-10 respectivamente. El efecto de la mutagénesis mostró variaciones en las características morfológicas y fisiológicas de la cepa silvestre INIFAP-Hir-2. La cepa 53-10 mostró mejoramiento en producción de conidios, comparada con la cepa silvestre sin afectar la patogenicidad sobre el insecto.

Respecto a la elaboración de formulados, al séptimo día de la inoculación en el medio suplementado con glucosa a una concentración de 36 g/L y casaminoácidos con una relación 10:1 mostró los mejores rendimientos de biomasa con una producción de 19.47 g/L, estadísticamente fue el único medio con mejor rendimiento que los demás. La mayor concentración de peso seco se obtuvo cuando se utilizó como fuente de nitrógeno la harina de semilla de algodón (51.30 g/L) y harina de soya (48.40 g/L), los cuales mostraron diferencia significativa respecto a los medios suplementados con casaminoácidos, extracto de levadura y polvo de remojo de maíz. Se evaluó posteriormente la viabilidad en 9 diferentes arcillas, a las 24 horas se observaron diferencias significativas, el resultado sugiere que el tipo de arcilla influyó en el crecimiento y actividad del hongo. La sobrevivencia de la cepa después de ser secada por aire (<5% humedad) en tierra de diatomeas (Hyflo) mostró una viabilidad de 94% a los 6 días de evaluación y una producción de 1.78×10^7 conidios g^{-1} a los 12 días de su inoculación siendo la concentración más elevada obtenida en nuestro estudio. Los resultados mostrados son importantes, ya que el hongo es de lento crecimiento y si se puede lograr rendimientos altos de biomasa en corto tiempo, posteriormente se podrán inocular sustratos sólidos para obtener buena esporulación también en corto tiempo.

ABSTRACT

Hirsutella citriformis Speare is an entomopathogenic fungus that has the potential to develop as a control agent for *Diaphorina citri* Kuwayama, vector of the most devastating disease known as Huanglongbing (HLB) which causes the productive death of citrus plants once infected. However, the fungus has slow growth and reduced production of conidia. It is hypothesized that random mutagenesis would result in an improvement of such characteristics. Therefore, in the present work eight strains of *Hirsutella citriformis* were evaluated to determine their characteristics of conidia production, germination rate and radial growth. Also was verified the number of nuclei, with the purpose of choosing a candidate strain for genetic improvement, in the INIFAP-Hir-2 strain. Techniques such as biphasic culture on different low-cost substrates (sorghum, rice and oats) were evaluated to obtain the highest conidia production that would be used in classical mutagenesis with the chemical agent ethyl methane sulfonate (EMS) which has been successfully used to introduce changes of a single base in the DNA, a mutation protocol was established varying times and concentrations for the obtaining of mutant strains, which were characterized based on radial growth, production of conidia and speed of germination in media as PDA and PDA with yeast extract. The microculture technique was used to know the fungal structure of the selected strains, and contact bioassays were carried out against *Diaphorina citri* adults to determine mortality. On the other hand, 6 liquid media with different concentrations of coal and different proportions of Coal-Nitrogen were evaluated using low-cost nitrogen sources to obtain a high biomass production and to formulate dry formulations using different clays as support. Statistical analysis showed that the INIFAP-Hir-2, IB-Hir-1 and INIFAP-Hir-5 strains showed the highest radial growth rate, showing values of 3.63, 3.67 and 3.60 cm respectively, at 50 days incubation in PDA. The radial growth rate ranged from 0.057 cm / day (IB-Hir-2) to 0.073 cm / day (INIFAP-Hir-2) in PDA medium, whereas in 0.5% PDAY medium was 0.084 (INIFAP-Hir-4) at 0.1cm / day (INIFAP-Hir-2, INIFAP-Hir-6). At 5 weeks of incubation, the INIFAP-Hir-2 strain showed the highest conidia production and differed significantly from the rest of the strains. The INIFAP-Hir-2 strain at 48 hours reached 95% germination in the PDA medium and was identified as mononucleate. In the bifasic culture, the highest concentration of conidia was obtained with the IB-Hir-2 strain on oats substrate with 9.33×10^6 conidia g^{-1} , followed by INIFAP-Hir-2 with 8.58×10^6 , and there was no significant difference between the two values. In experiments on conidia production in oats and rice, oats promoted significantly more conidia production than rice, and as for the container, plastic was better than glass, with a production of 52.76×10^6 conidia / g at 28 days. The INIFAP-Hir-2 strain was selected for mutation based on its conidia production and radial growth rate characteristics. Regarding the mutagenesis, the selection was based on its survival, obtaining a total of 63 colonies. The mutants showed different phenotypes as well as variations in morphological characteristics. Strains 103-15, 103-17, 101-19, 101-21, 101-23 and 51-11 showed significant differences with respect to mutant 53-10 and control. Strain 53-10 produced 7.61×10^6 conidia / ml showing a significant difference with respect to the wild strain with a production of 3.05×10^6 conidia/ml at six weeks of incubation in Petri dish in 1% PDAY culture medium. Regarding the results of germination speed, at 24 hours was observed that the

mutant strain 53-10 showed significant difference with respect to the three remaining mutated strains and partial difference with respect to the wild strain. The mutant strains that produced the highest number of conidia on agar were subsequently evaluated on the oat substrate. When microcultures were carried out, a significant difference was found in the diameter of the conidia formed by the mutant strains 101-11, 53-10 and 51-6 with respect to the wild strain and the strain 103-9. The results obtained in the bioassay, on the ninth day in our study, showed 84% and 98% mortality for the wild and mutant strain 53-10 respectively. The effect of mutagenesis showed variations in the morphological and physiological characteristics of the wild-type strain INIFAP-Hir-2. Strain 53-10 showed improvement in conidia production compared to the wild strain without affecting the pathogenicity on the insect. With respect to dry weight obtained in liquid media, on the seventh day of inoculation in the medium supplemented with glucose at concentration of 36 g / L and casamino acids with a ratio of 10: 1 showed the best yields of biomass with a production of 19.47 g / L, statistically was the only medium with better performance than the others. The highest dry weight concentration was obtained when cottonseed flour (51.30 g / L) and soybean meal (48.40 g / L) were used as the nitrogen source, which showed a significant difference with respect to the medium supplemented with casamino acids, yeast extract and corn steep powder. The viability of culture was evaluated in 9 different clays, at 24 hours significant differences were observed, the result suggests that the clay type influenced the growth and fungus activity. The survival of the strain after being air-dried (<5% moisture) in diatomaceous earth (Hyflo) showed a viability of 94 % at 6 days of evaluation and a production of 1.78×10^7 conidia .g⁻¹ at 12 days of its inoculation being the highest concentration obtained in our study. The results shown are important, since the fungus is slow growing and if high yields of biomass can be achieved in a short time, then solid substrates can be inoculated to obtain good sporulation also in a short time.

1. INTRODUCCION

En nuestro país la citricultura representa, una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura. México es el quinto productor de cítricos en el mundo, tiene una extensión de 526 mil hectáreas establecidas en 23 estados del país, en los que se producen, aproximadamente, 6.9 millones de toneladas anuales, con un valor superior a los 8,050 millones de pesos. (SAGARPA, 2012). Lamentablemente hay factores limitantes en la agricultura entre los cuales figuran plagas por insectos, que constituyen un riesgo latente en la obtención de mayores y mejores cosechas y ha sido un hecho recurrente en la historia de la agricultura. La FAO estima que las pérdidas en la producción agrícola mundial causadas por diferentes plagas fluctúan entre 20% y 40%. Actualmente, la enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB) representa un elevado riesgo para la citricultura nacional. Esta enfermedad es causada por tres formas de la bacteria *Candidatus Liberibacter*, la cual es de reciente introducción a México (Julio, 2009) y es transmitida por el insecto vector *Diaphorina citri* Kuwayama (SENASICA, 2011). La enfermedad HLB aún no ha sido posible controlarla y los árboles infectados mueren en el transcurso de algunos años, por lo que la prevención o control del vector es de suma importancia (García, 2009).

A nivel mundial la estrategia de control se encuentra basada en disminuir al máximo al vector de la enfermedad, para lo cual se contempla la implementación de una serie de prácticas fitosanitarias (Aubert et al. 1996; Da Graca y Korsten 2004). Para su control se puede hacer uso de una gran variedad de productos químicos existentes en el mercado los cuales han demostrado proporcionar un efectivo control del psílido (Khangura et al. 1984; Rae et al. 1997) pero estos incrementan el costo de producción y pueden ocasionar daños en los ecosistemas. Por lo cual se requiere desarrollar e implementar programas de control que tengan menor efecto dañino en la naturaleza, el control biológico es una buena alternativa con que se cuenta para combatir al vector.

Entre los agentes de biocontrol contra insectos se encuentran depredadores, parasitoides y patógenos (Clarckson and Charnley 1996). Entre estos últimos se encuentran los hongos y son muy valorados para el control biológico de insectos.

Una gran variedad de hongos entomopatógenos se han reportado como entomopatógenos de *Diaphorina citri*, incluyendo *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith (Samson 1974, Subandiyah et al. 2000), *Hirsutella citriformis* Speare (Rivero-Aragon and Grillo-Ravelo 2000, Subandiyah et al. 2000, Étienne et al. 2001), and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Rivero-Aragon and Grillo-Ravelo 2000).

En México, como en otras partes del mundo, se ha identificado a *Hirsutella citriformis* micosando a *Diaphorina citri*. Una característica importante de *Hirsutella citriformis* es que ataca a insectos de tres órdenes entre los que están ausentes aquellos que son parásitos o depredadores de *Diaphorina citri*. Lo anterior hace de este entomopatógeno un excelente candidato para el control del insecto plaga.

Diversos trabajos han sido reportados en años recientes relativos al aislamiento y selección de cepas de *Hirsutella citriformis* aisladas de liviidos adultos en varias partes del mundo (Cabrera et al. 2004; Meyer et al. 2007; Rivero-Aragón y Grillo-Ravelo 2000; Subandiyah et al. 2000) así como de pruebas a nivel de laboratorio y campo (Casique-Valdes et al. 2011; Orduño-Cruz et al. 2015; Pérez-González et al. 2015; Meyer et al. 2007) donde presentan diversos niveles de mortalidad de los liviidos. Aunque se ha mostrado su efectividad, este hongo presenta diversas desventajas respecto a otros hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea*, en cuanto a velocidad de crecimiento, velocidad de germinación y producción de conidios, entre otras; por lo que con este trabajo planteamos la posibilidad de mejorar estas características mediante el desarrollo de mutagénesis usando un agente químico, el metanosulfonato de etilo (EMS) para abrir la

posibilidad de obtener mutantes con características mejoradas de producción de conidios y velocidad de germinación, pero manteniendo los niveles de patogenicidad contra el liviido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Presencia del HLB en el mundo.

Una de las enfermedades más devastadoras y temidas de los cítricos es el Huanglongbing (HLB) cuyo nombre chino significa enfermedad del brote amarillo o “dragon amarillo” y a menudo referido como enverdecimiento de los cítricos “citrus greening” en los países de habla inglesa. El HLB se presume que se originó en el sur de China, donde Lin Kung Hsiang realizo investigación ardua del año 1941 a 1955, en el distrito de Chaoshan de la provincia de Guangdong descubrió que la enfermedad era transmisible y le dio el nombre de Huanglongbing (HLB) o enfermedad del brote amarillo. (Batoool et al. 2007) Hace varios años se descubrió en dos de las mayores regiones productoras de cítricos en el mundo; en Brasil 2004 (Texeira et al. 2005), y más tarde en Florida en agosto de 2005 (Halbert, 2005; Bové, 2006). Poco después la infección se expandió a Cuba, México, Belice, Nicaragua, Honduras y República Dominicana (OIRSA, 2009) (**Figura 1**)

El liviido *Diaphorina citri* Kuwayama es el principal vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter* causante de la enfermedad HLB (Bové, 2006), es una bacteria Gram negativa y pertenece a la α subdivisión de la proteobacteria (Jagoueix et al. 1994 citado por Subandiyah et al. 2000). La clasificación *Candidatus* se asigna a estas bacterias por el Comité Internacional de Bacteriología Sistemática porque las tres especies bacterianas no pueden ser mantenidas en cultivo bacteriano. Basado en su secuencias 16S rDNA, existen tres variantes de esta bacteria, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) (Gottwald et al. 2007), *Candidatus Liberibacter africanus* (Laf) y *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam) (**Figura 2**). Lam se encontraba solo en Brasil pero ahora ya

hay reportes en China. Laf tiene reportes en Arabia Saudita y en algunas islas del Océano Indico (Bové 2008).

La enfermedad se transmite desde plantas infectadas a plantas sanas por liviidos alimentándose de la savia. *Diaphorina citri* actua como vector en Asia y America y *Trioza erytreae* en África y se considera la plaga más importante de los cítricos en el mundo (Halbert & Manjunath 2004).

El ciclo de transmisión del patógeno causante del HLB por su vector *D. citri* es extremadamente rápido. Actualmente no existen tratamientos eficaces para combatir la infección, una vez infectado el árbol no tienen cura y estos deben ser removidos y destruidos para reducir la diseminación de la enfermedad. Se han devastado millones de hectáreas de los cultivos de cítricos en todo el mundo; tan solo en África y Asia, causó la muerte de 60 millones de árboles (da Graca y Korsten 2004; Thohirah et al. 2009); mientras que en Sao Paulo, Brasil, en el período de 2005-2013 fue responsable de la eliminación de aproximadamente 35 millones de árboles (Portal Frutícola 2014).

Los síntomas comunes de HLB son clorosis y manchas en las hojas, coloración y forma desigual en los frutos, sabor amargo. El síntoma amarillento se asemeja a algunas deficiencias de nutrientes (especialmente la deficiencia de zinc) (**Figura 3**), lo que hace difícil distinguir a partir de tales deficiencias. Se requiere un análisis molecular para un diagnóstico más preciso (Albrecht & Bowman 2008). Los síntomas de HLB no aparecen en las hojas durante meses o años después de la infección inicial. Existe un limitado conocimiento sobre la propagación de la enfermedad durante la fase asintomática. Cuando la enfermedad va comenzando se caracteriza por que las plantas presentan uno o varios brotes amarillos, que destacan entre el follaje verde del resto del árbol, estos brotes son los que le dan el nombre a la enfermedad (Huanglongbing); con el paso del tiempo, la bacteria va invadiendo todo el árbol y los brotes amarillos se observan en todo el follaje (Bové 2006).

El género *Candidatus Liberibacter* se distribuye de manera heterogénea en el floema de la corteza, en la nervadura central de las hojas, en raíces, en diferentes partes florales y en frutos. (Tatineni et al. 2008).

Taxonomía *Candidatus Liberibacter* spp. **Clase:** Alphaproteobacteria **Orden:** Rhizobiales **Familia:** Rhizobiaceae **Género:** *Candidatus Liberibacter*

Especie: *Candidatus Liberibacter africanus* (Jagoueix et al. 1994)

Candidatus Liberibacter asiaticus (Jagoueix et al. 1994)

Candidatus Liberibacter americanus (Texeira et al. 2005)

2.2 Presencia del HLB en México.

En México, la enfermedad fue primero detectada en arboles de traspatio del municipio de Tizimin, Yucatán en el 2009. Actualmente la enfermedad ha sido detectada en 16 de los 24 estados citrícolas del país lo que representa el 6.1% de la citricultura nacional (SENASICA 2014). Yucatan (Julio 2009), Quintana Roo (Agosto 2009), Nayarit y Jalisco (Diciembre 2009), Campeche (Marzo 2010), Colima (Abril 2010), Sinaloa (Julio 2010), Michoacán (Diciembre 2010), Chiapas (Marzo 2011), Baja California Sur e Hidalgo (Agosto 2011), Tabasco (Diciembre 2012), Guerrero (Marzo 2013), Puebla y Zacatecas (Septiembre 2013), Oaxaca (Abril 2014). El mapa muestra la distribución de HLB en México (**Figura 4**).

2.3 Daño e impacto económico.

México se encuentra entre los países líderes productores (**Figura 5**), por tal motivo la ocurrencia de *D. citri* y HLB es una seria amenaza para la industria citrícola.

Los efectos negativos del HLB comprenden: a) reducción de la producción citrícola nacional, b) reducción de fuentes de empleo en campo, agroindustria y actividades afines (hasta 90,000 empleos). c) Disminución de los productos derivados de los cítricos. d) Disminución de ingresos por exportación de cítricos y derivados. e) Disminución de ingresos a nivel nacional. (Salcedo et al. 2010).

2.4 *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)

Fue descrito por primera vez en Taiwan por Kuwayama en 1908 (Halbert & Manjunath 2004). También conocido como Psílido Asiático de los Cítricos (PAC), es una importante plaga en todo el mundo. Además de que en infestaciones fuertes puede matar los brotes vegetativos o causar la abscisión de las hojas de los cítricos, es el vector primario de CLas y CLam (Halbert & Manjunath 2004).

El PAC tiene afinidad por plantas de la familia Rutaceae donde causa daños directos e indirectos, los primeros resultan de la gran extracción de savia en los brotes tiernos, lo cual debilita las plantas, que se manifiestan como clorosis, necrosis en los tejidos y caída de las hojas. Un daño indirecto es provocado por el denso desarrollo de Fumagina, favorecido por la secreción de miel de rocío sobre las hojas.

Las características necesarias para el desarrollo del PAC está influenciada por múltiples componentes bióticos y abióticos, sobresalen de estos últimos, las temperaturas altas, más de 30° C, humedad relativa y precipitación, (Aurambout et al. 2009) y su pico poblacional tiene relación directa con la

disponibilidad de brotes tiernos con lo que su aparición puede coincidir con la del minador de los cítricos.

2.4.1 Ciclo de vida

La especie *Diaphorina citri* presenta un corto periodo de vida y una alta fecundidad. Las hembras, tienen un periodo de ovoposición de 12 días y son capaces de depositar varios huevos por jornada, los cuales eclosionan a los 3 días en verano y hasta los 23 días en invierno. El ciclo completo es de 15-47 días, pudiendo existir hasta 10 generaciones por año. (Sánchez 2010). Las hembras pueden poner hasta 800 huevos a lo largo de su vida. (Halbert and Manjunath 2004)

El ciclo de vida del liviido incluye la etapa de huevo, cinco instares ninfales y adulto (**Tabla 1.**) (Bové, 2006). Los adultos y ninfas deben alimentarse de brotes tiernos para madurar sus huevos y completar su desarrollo. (Tsai et al. 2000, Fernández & Miranda 2005). La duración total del ciclo (de huevo a adulto): 20 a 40 días, con una longevidad de 3 a 4 meses, dependiendo de las condiciones climáticas. Aunque del 1° al 3° estadio ninfal, no es capaz de adquirir la bacteria. En el 4°, 5° instar, y como adulto son capaces de adquirir y transmitir la bacteria, pero los adultos debido a que vuelan son contribuidores significantes para dispersar la enfermedad. (Inoue 2009). No transmite la enfermedad a la descendencia (solamente adultos la transmiten hasta el final de su vida). (García 2009).

Para que la bacteria sea adquirida el insecto requiere un tiempo de alimentación de 15 minutos a 24 horas; una vez adquirido el patógeno, este se reproduce en el organismo del liviido, el cual, después de 25 días, puede empezar a dispersar la enfermedad (Hall 2008).

El tiempo de ninfa a adulto es de 13 días con temperatura de 25°C (Tsai y Liu 2000). Los adultos de *Diaphorina citri* miden de 2.7 a 3.3mm de longitud;

tienen las alas moteadas de color café; pueden saltar y volar a cortas distancias cuando son perturbados en la planta. (Hall 2008). Los adultos adquieren la madurez sexual entre los 2 y 3 días después de pasar el 5° instar y la oviposición la inician 1 o 2 días después del apareamiento (Tsai y Liu 2000). El liviido es un insecto chupador y así inserta sus partes bucales en tejidos de las plantas para alimentarse. Las ninfas se alimentan de las hojas jóvenes y tallos, secretan continuamente grandes cantidades de mielecilla y una sustancia cerosa filiforme (Hall y Albrigo 2007) mostrado en la **figura 6**.

2.4.2 CLASIFICACION TAXONOMICA DE *Diaphorina citri*

Recientemente, Burckhardt & Ouvrad, (2012) proponen una nueva clasificación para la superfamilia Psylloidea, donde el género *Diaphorina* se reclasifica dentro de la familia Liviidae y subfamilia Euphyllurinae. Sin embargo, esta nueva clasificación no se ha incluido todavía en los artículos publicados recientemente.

Filum: Artropoda **Clase:** Insecta **Orden:** Hemiptera **Suborden:** Sternorrhyncha **Superfamilia:** Psylloidea **Familia:** Liviidae **Subfamilia:** Euphyllurinae **Tribu:** Diaphorinini **Género:** *Diaphorina* **Especie:** *Diaphorina citri* **Sinonimia:** *Euphalerus citri*.

2.4.3 Distribución de *Diaphorina citri*

Actualmente, se considera un insecto plaga con categoría cuarentenaria y está ampliamente establecido en las zonas citrícolas del mundo (EPPO 2005)

La presencia del liviido se informó por primera vez en Brasil en la década de 1940 y en Estados Unidos se observó en Florida en 1998 (Halbert et al. 1998).

Más tarde se encontró en todos los estados cítricos, desde entonces, se encuentra difundido ampliamente entre las islas y países adyacentes, incluyendo las Bahamas, las Islas Caimán, Jamaica, República Dominicana, Cuba, Puerto Rico, Venezuela, (Halbert y Nuñez 2004). Está presente en toda Europa, en el continente americano y sobre todo en Asia (China, Japón, Malasia, Vietnam, Indonesia, la India).

En varios lugares de Florida, la bacteria se registró por primera vez en los liviidos y la posterior detección en las plantas en el campo se verificó seis meses a tres años después del hallazgo inicial en los liviidos (Manjunath et al. 2008).

En México *D. citri* se detectó por primera vez en 2002 en los estados de Campeche y Quintana Roo. (López-Arroyo et al. 2009; Thomas 2007; López-Arroyo et al. 2005). En 2003, *D. citri* fue reportada en los estados de Nuevo León y Tamaulipas (López-Arroyo et al. 2004, 2005; Ruiz et al. 2004, 2006); mientras que en 2004 se registró en los estados de Colima, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Yucatán (López-Arroyo et al. 2005). En el 2008 se reportó en el estado de Baja California (SENASICA, 2014). Por otra parte, en México, desde el 2009, se tiene registro del patógeno en 12 de los 24 estados productores de cítricos del país (**Figura 7**), aunque con una distribución limitada en cada estado (SENASICA 2014). Actualmente su presencia ya ha sido detectada en todos los estados productores de cítricos. Las poblaciones de PAC deberán ser mantenidas lo más bajo posible para minimizar la dispersión de la enfermedad HLB.

2.4.4 Control del PAC

Actualmente no hay un control exitoso para la enfermedad (Halbert & Manjunath 2004), A nivel mundial la estrategia de control se encuentra basada en disminuir al máximo al vector de la enfermedad, para lo cual se contempla la implementación de una serie de prácticas fitosanitarias (Aubert et al. 1996; Da Graca y Korsten 2004) como la detección temprana a través de la exploración

vigorosa y la remoción de árboles infectados, que se ha recomendado para reducir la propagación de la enfermedad (Manjunath et al. 2008). En los últimos años la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se considera una técnica que otorga resultados rápidos y fiables de la detección de la infección (Jagoueix et al. 1996) y para los árboles que den positivo la única opción es removerlos totalmente. También para su control se puede hacer uso de una gran variedad de productos químicos existentes en el mercado los cuales han demostrado proporcionar un efectivo control del psílido (Khangura et al. 1984; Rae et al. 1997) pero estos incrementan el costo de producción y pueden ocasionar daños en los ecosistemas. Por lo cual se requiere desarrollar e implementar programas de control que tengan menor efecto dañino en la naturaleza, el control biológico es una buena alternativa con que se cuenta para combatir al vector.

2.4.5 Enemigos Naturales del PAC

Como enemigos naturales del PAC, los depredadores coccinélidos se han considerado los más importantes agentes de control biológico (Michaud *et al.* 2002, 2004). Dentro de los parasitoides más específicos se encuentra *Tamarixia radiata* Aubert (1987). No existen parasitoides para la etapa de huevo y los adultos parecen ser bastante libres de enemigos naturales (Husain and Nath 1927). En la **Tabla 2** se muestra un resumen de los trabajos reportados utilizando agentes de control biológico como parasitoides, depredadores y HE utilizados en el control de *Diaphorina citri*.

2.5 Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos difieren de otros grupos de patógenos de insectos en su capacidad para invadir al hospedero mediante la penetración de su cutícula. Aunque actualmente están siendo usados como bioplaguicidas en todo el mundo, su uso sigue siendo limitado debido a la lenta velocidad de matanza y resultados inconsistentes en relación con los insecticidas químicos, aun las cepas

altamente virulentas pueden tomar de 2-5 días para matar a los insectos (Thomas & Read 2007).

Algunos hongos entomopatógenos tienen deficiencias por ejemplo la capa mucosa que cubre los conidios de *Hirsutella citriformis* no logra que se disperse eficientemente en campo; su baja tasa de esporulación, su crecimiento irregular también disuaden su eficiencia (Casique-Valdes et al. 2011; Hall et al. 2012), así que es necesario mejorar la virulencia y patogenicidad para la mejora del micoinsecticida (Fang et al. 2009). Para esto, el mejoramiento genético es uno de los enfoques más prometedores. (Kava-Cordero et al. 1995).

2.5.1 *Hirsutella citriformis* contra *Diaphorina citri*

En un estudio realizado en Cuba sobre hongos entomopatógenos, (Álvarez et al. 1994), encontraron en árboles de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle) y en plantas de *Murraya paniculata* (Lin) Jack., ninfas y adultos de *Diaphorina citri*, infectados por *Hirsutella citriformis* Speare, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., y *Paecilomyces* sp, éste último afectando solamente psílicos adultos. En Indonesia se observaron tasas de infección de 82.9% y de 52.2% en adulto cuando la humedad relativa era mayor del 80% (Subandiyah et al. 2000), se ha observado una mayor mortandad en los adultos de *Diaphorina citri* con relación a las ninfas, y que la concentración más eficaz para matar a *Diaphorina citri* fue de 10^8 conidios por mililitro, con un promedio de 11.7 días para ocasionar su muerte (Dwiastuti y Kurniawati 2007).

Ademas en Estados Unidos, (Meyer et al. 2007) utilizando conidios cosechados del sustrato arroz, informo que los insectos murieron 9-10 días después la inoculación a 25° C y aproximadamente 100% HR,

En otros estudios, se ha mencionado que es común observar al hongo *Hirsutella citriformis* Speare, controlando liviidos, cuando la humedad relativa

era mayor del 80%, lo que es determinante para su crecimiento y esporulación. (Étienne et al. 2001). En la comunidad La Laja de Colomán, Tuxpan, Veracruz, se detectaron liviidos adultos infectados por *Hirsutella* sp., cuando se tenía una humedad relativa entre 50% a 60%. (González et al. 2008) En Tamaulipas, Casique-Valdez et al. (2011) confirmo la identificación de cepas mexicanas de *Hirsutella citriformis* aislados de *Diaphorina citri* después de 6 días de la inoculación con conidios de *Hirsutella citriformis*, los insectos murieron y los sinemas emergieron de los cadaveres de los insectos después de 10 días. Perez-Gonzalez et al. (2015) aislaron cepas de *Hirsutella citriformis* de *Diaphorina citri* infectados en muestras tomadas de ocho estados diferentes de México: Tabasco, San Luis Potosí, Quintana Roo, Yucatán, Campeche, Chiapas, Veracruz y Colima, las cuales fueron identificadas mrofologica y molecularmente.

2.5.2 Taxonomía *Hirsutella citriformis*

Hace algunos años, se realizó una reclasificación de la familia Clavicipitaceae (Sung et al. 2007), a la que pertenecía mayormente el género *Cordyceps* y se formaron tres subtipos (Familias) donde se reclasifican las especies tradicionales del género: Familias: Clavicipitaceae, Cordycipitaceae, Ophiocordycipitaceae. (Humber 2007)

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Ophiocordycipitaceae

Género: *Hirsutella*

Especie: *Hirsutella citriformis*

2.5.3 Morfología de *Hirsutella citriformis*

“Hirsutus” viene del griego que significa “peludo” combinado con el sufijo diminutivo latino “ella” para describir el estrecho y prolongado cuello de las células conidiogénicas (Patouillard 1892). *Hirsutella citriformis*, es un patógeno limitado para hemípteros con aislamientos previamente reportados principalmente de chicharritas. Aunque también se conoce a partir de Psocoptera (Toledo et al. 2008). Una característica distinguible en medio de cultivo es su lento crecimiento, con una media de 5 cm de diámetro después de un mes de cultivo en Papa Dextrosa Agar a 25°C (Meyer et al. 2007). Aislados de *Hirsutella* presentaron el más lento crecimiento, germinación y esporulación, solo un 30% de conidios había germinado después de 96 horas (Orduño 2015)

El hongo *Hirsutella citriformis* cubre a los adultos de *D. citri* con micelio amarillento grisáceo, fructificaciones delgadas, largos y cilíndricos hasta 2 cm de largo. En la base de los sinemas surgen cuellos alargados, casi filamentosos de 20-35µm de largo, no ramificados, que producen en la punta generalmente una sola conidia: estas son elongadas, allantoides-cimbiformes (forma de gajos de naranja) o fusiformes, de 6.8-7.0 x 1.7 – 2 µm rodeadas de una capa mucilaginosa de forma ovoide o de limón que frecuentemente se disuelve en agua (**Figura 9**). (Sánchez-Peña et al. 2011). Subandiyah et al. (2000) menciona que alrededor de la quinta semana después de la inoculación de *Hirsutella citriformis* se desarrollaron sinemas, las fialides tenían forma de botella, los conidios se presentaban en forma solitaria, hialinos de 6.4-7.6 x 2.1-2.8µm cubiertos con una capa mucilaginosa.

2.5.4 Producción de hongos entomopatógenos

La producción en masa de hongos entomopatógenos es un requisito necesario para cualquier aplicación en campo. La técnica más frecuente para el cultivo, es en superficie sobre un sustrato sólido humedecido o un cultivo

sumergido en un medio líquido (Feng et al. 2000). El cultivo sumergido puede tener la ventaja de que los hongos se pueden generar rápidamente usando fermentadores de tanque profundo convencionales y el escalamiento del proceso es relativamente fácil. Los cultivos sumergidos también tienen una serie de atributos muy deseables: son más baratos, en particular a gran escala; factores ambientales (pH, pO₂, pCO₂, los niveles de nutrientes) pueden ser controlados más fácilmente, y el crecimiento puede ser monitoreado.

El conocer los requerimientos nutricionales es la primera necesidad para el cultivo de microorganismos usando cualquier técnica. Los carbohidratos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos están compuestos de macro elementos como el carbón, hidrogeno, nitrógeno, azufre, fosforo y estos están involucrados en mecanismos como la interacción de patógenos y mecanismos de defensa. El carbón es el componente principal. La elección del hongo y la composición de los medios utilizados son los responsables del crecimiento micelial y de la producción de esporas. Para el pleno crecimiento de microorganismos, los macroelementos como el carbón, hidrogeno, oxígeno, azufre, fosforo y nitrógeno son requeridos para la formación de ácidos nucleicos y proteínas. Otra fuente común de carbohidratos es el almidón derivado de granos tales como el maíz, trigo, sorgo, cebada, arroz y avena. La composición de varios granos es mostrada en la **Tabla 3**.

La preparación usada para el crecimiento puede ser en forma líquida o sólida. La fuente de nutrientes es determinante para el crecimiento y virulencia del hongo entomopatógeno.

2.5.5 Medios de cultivo

El uso de fermentación en cultivo líquido ha sido el método de elección para la producción industrial de diversos productos microbianos, la producción de bioplaguicidas microbianos no es la excepción. La mayoría de los bioinsecticidas se producen utilizando tanques de fermentación profunda (Copping 2001). Mientras que la mayoría de bioplaguicidas a base de hongos

para el control de insectos se producen comercialmente como conidios ya que los conidios son los propágulos más viables empleados en programas de biocontrol y se producen generalmente en cultivo sólido, y esto fue gracias a Metschnikoff que a finales de 1870 fue quien propuso el concepto de controlar los insectos con conidios producidos artificialmente. Existen diferentes métodos para la producción incluyendo la fermentación en sustrato sólido, donde el hongo crece como micelio superficial y produce conidios en hifas aéreas y que es el método más utilizado para la producción de conidios y la fermentación en cultivo líquido donde se producen blastosporas levaduriformes y microesclerocios. Desafortunadamente, el tiempo necesario para esporulación en sustratos sólidos generalmente requiere semanas y se utilizan grandes áreas y mano de obra existiendo un alto riesgo de contaminación, lo que resulta en altos costos de producción (Jackson et al. 1997; Li et al. 2010).

La fermentación en cultivo líquido por otro lado puede superar estos inconvenientes de producción proporcionando una forma más económica para producir propagulos fúngicos alternativos bajo condiciones nutricionales y ambientales controladas. (Jackson et al. 2003).

Se han estudiado distintas variables para mejorar el rendimiento y la esporulación de hongos entomopatógenos, la fermentación en cultivo líquido ideal debería producir en su mayoría o en su totalidad blastosporas e hifas cortas para dispersión óptima del inóculo a través del sustrato. Si existe abundante producción de micelio, especialmente en pellets o cluster, impide una buena dispersión e incluso la colonización del sustrato. Una amplia gama de medios se ha utilizado para la fase de fermentación líquida. La receta más simple es dextrosa/sacarosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno y vitaminas, sales no son necesarios (Cherry et al. 1999; Bateman 2007; Jaronski and Jackson 2012). En estudios recientes se han utilizado diversas fuentes de carbono y nitrógeno tales como sólidos de remojo de maíz, casaminoácidos y peptona de colágeno en el medio de cultivo, obteniendo así abundante micelio (Romero-Rangel et al. 2012).

Existen ventajas claras en la fermentación líquida para la producción de inóculo para la fase sólida. Los conidios requieren 24 horas para germinar completamente y comenzar la colonización del sustrato, mientras que en fermentación líquida (blastosporas y micelio) comienza inmediatamente. Además, la fase en fermentación líquida multiplica en gran medida el potencial del inóculo en comparación con conidios, porque un inóculo debe contener 10^7 - 10^8 propagulos por mililitro. La concentración de inóculo afecta a la duración de la fase de sustrato sólido para alcanzar el máximo rendimiento de conidios.

Pocas especies de hongos como *Hirsutella thompsonii* Fisher, pueden producir conidios en cultivos sumergidos. Por lo que algunos investigadores han optado por un proceso de producción en dos fases (cultivo bifásico), en el cual los cultivos líquidos son utilizados para producir una gran cantidad de micelio, el cual posteriormente se coloca sobre un sustrato sólido para la obtención de conidios. Es bien conocido que *In vitro* el crecimiento y la esporulación de *Hirsutella citrifomis* son lentas comparadas con muchos otros hongos entomopatógenos, requiere condiciones especiales, tres factores principales que influyen en la esporulación *in vitro* son comúnmente manipuladas: nutrición, luz y temperatura. Medios de cultivo naturales son adecuados para la esporulación, el almacenamiento y para mantener la viabilidad (Dhingra & Sinclair 1995).

Utilizando fermentación sustrato-sólido, la maximización del área de superficie es una preocupación importante para la mejora de la producción de conidios. La producción de conidios de alta calidad no solo requiere una enorme superficie de área sino además una óptima temperatura, alta humedad y luz natural, como lo hace en los cadáveres del insecto (Ye et al. 2006). Pequeños granos suelen ser un sustrato excelente con una gran superficie por peso y la humedad deseada para la formación de conidios, la producción de conidios en gran escala se puede realizar sobre diferentes sustratos de origen vegetal, como papa, trigo, soya, avena, arroz y trigo (Barajas et al. 2010).

En sentido estricto, la fermentación en sustrato sólido es realmente bifásica ya que existe un paso inicial de ser una fermentación líquida para producir un inóculo. Una amplia variedad de materiales orgánicos han sido evaluados como sustratos. Aunque el arroz y la cebada parecen ser los principales sustratos utilizados en los trópicos, se ha producido un considerable esfuerzo para identificar los materiales agrícolas de bajo costo, tales esfuerzos han sido particularmente frecuentes en la India, Pakistán y China. Figueroa et al. (2007) reportó que para la producción masiva utilizaron los sustratos: arroz y avena, los granos enteros de los sustratos se hidrataron durante 12 h y se esterilizaron dos veces a 121°C durante 15 min a 15 lb de presión en días consecutivos. La avena mostró tener mayor rendimiento en la esporulación del hongo *P. fumosoroseous*. Sin embargo varios sustratos inorgánicos han sido identificados en los recientes años, se incluyen gránulos de tierra de diatomeas (Jaronski and Jackson 2012).

Por otra parte, la formulación es fundamental para la estabilización de los propagulos que constituyen la materia activa del micoinsecticida. Mediante la estabilización debe mantenerse la viabilidad de los propagulos durante el almacenamiento y su posterior aplicación en campo. Así los conidios pueden formularse en arcillas o en aceites vegetales. El término de “arcilla” usualmente denota un material de la tierra granizado de fina contextura y la descripción de arcilla se basa en: situación depositaria, granulometría, composición química y mineralogía. Diversos tipos de arcillas se han empleado para incrementar la longevidad en almacenamiento por permitir el secado del conidio (Moore y Higgins 1997)

El uso de hongos en el control de plagas dañinas de la agricultura depende de diferentes factores, incluyendo la capacidad de producir altas concentraciones de propágulos estables a un costo razonable (Jaronski 1986; Latgéet et al. 1986).

2.6 Mutaciones

Las mutaciones son cambios en la secuencia genética, y ellos son la principal causa de diversidad entre organismos. Aunque existen varios tipos de cambios moleculares, la palabra “mutación” típicamente se refiere a un cambio que afecta a los ácidos nucleicos. (Laurence Loewe 2008; Summet and Oliver, 2009). La FAO, (2012) define la mutación como “cualquier cambio en el genoma con respecto al definido como tipo silvestre”. Pueden ocurrir a nivel de ploidía, cariotipo, o secuencia de nucleótidos. La mayoría de las últimas son silenciosas (*p. ej.*, no se pueden asociar con cambios en el fenotipo), bien porque la secuencia de ADN afectada no se corresponda con la parte codificante del genoma, o porque el cambio específico no altere la función de una secuencia codificante. Las mutaciones nos sirven para llevar a cabo una correlación entre genotipo y fenotipo.

En general, se cree que el ADN es el objetivo más importante para la inducción de mutaciones por agentes químicos, físicos y biológicos. Las mutaciones que se inducen al azar, no es posible predecir en que gen o parte de una secuencia aparecerá la mutación (Timbrell 2002). Muchos estudios se han centrado en las interacciones entre el ADN y los mutagenos químicos. (Sega 1984)

La mutagénesis puede ser dirigida o inducida. En la mutagenesis dirigida se define como aquellas mutaciones precisas que se provocan en un gen deseado. En la inducida se utilizan mutagenos químicos o físicos que provocan cambios al azar y de una manera generalizada en todo el genoma (Griffiths et al. 2008).

Diferentes métodos han sido usados para introducir mutaciones al azar en diferentes microorganismos, usando diferentes productos químicos como ácido nitroso, hidroxilamina, y metanosulfonato de etilo (EMS), así como métodos físicos como radiación UV, o métodos biológicos como transposones. El principal efecto de agentes mutagénicos se basa en la creación de una lesión o de

una modificación en la secuencia de bases de la molécula de ADN. Si esta lesión no se repara la mutación es causada. Los procedimientos mutagenicos pueden ser optimizados en términos de tipo de mutageno, la dosis y la temperatura. En investigaciones similares Ahmed et al. 2007 han reportado que el tratamiento químico es más eficiente en inducir altos niveles de mutaciones en comparación con la radiación UV.

2.6.1 Metanosulfonato de etilo (EMS)

Es un éster del ácido metanosulfónico (**Figura 10.**), agente alquilante denominado así por incorporar grupos alquilo a las macromoléculas siendo el mutagénico más potente hasta ahora descubierto (Sega 1984) que induce mutaciones puntuales - de las bases nitrogenadas por AT transición a GC. (Ribeiro et al. 2013). Eso puede ser debido al hecho que EMS induce cambios permanentes en la estructura del DNA. Durante el proceso de sustitución de nucleótidos, el grupo etil del EMS reacciona con el grupo cetona situado en la posición 6 de la guanina en DNA y resulta en la formación de la base anormal O⁶-etilguanina. Esta no puede formar un puente de hidrogeno y por lo tanto no puede aparearse con la Citosina y si con la Timina durante la replicación del ADN; las ADN polimerasas que están implicadas en catalizar el proceso, con frecuencia colocan timina, en lugar de citosina frente a O – 6 – etil guanina. Por lo tanto, esta molécula contiene un par GT anormal en lugar de uno GC y así siguiendo las rondas de replicación, el actual par de base GC tiende a convertirse al par AT (Jimenez 1983; Passarge 2007) (**Figura 11**)

Miembro de la clase de agentes etilantes monofuncionales (Sega 1984). Es un líquido incoloro con un punto de ebullición de 213 a 213.5°C (761mm Hg) (Merk 1989). Cuando EMS es sometido al proceso de descomposición emite humos tóxicos de óxidos de azufre (Budak-Diler and Topaktas 2010). Tiene una densidad de 1.1452 a 22°C (IARC, 1974). Su síntesis se lleva a cabo por la reacción de metanosulfonato anhídrido con alcohol etílico (Sega 1984)

En las bacterias, donde se han analizado las mutaciones con gran detalle, las principales mutaciones detectadas son transiciones GC → AT, lo que indica que la alquilación O-6 de la guanina es la más relevante para la mutagenesis (Coulondre y Miller 1977).

En años recientes, la efectividad de este agente alquilizante en inducir mutaciones se ha investigado exitosamente en una gran variedad de organismos, incluyendo bacteriófagos, bacterias, insectos, hongos y plantas superiores. Los carcinógenos que sean alquilantes pueden ser destruidos por reacción con nucleófilos tales como agua, iones hidroxilo, amoníaco, tioles y tiosulfato. El EMS es moderadamente soluble en agua y puede ser destruido en solución de tiosulfato de sodio al 10%

2.6.2 Mutagénesis en Hongos

Se ha utilizado la inducción de mutaciones con EMS en diversas investigaciones para obtener características mejoradas. Se ha logrado reducir la esporulación de la cepa de *A. niger* CFR 335 sin ningún efecto sobre la producción de fitasas. La no esporulación es un cambio genotípico importante que lleva relación con la alteración de un gen particular responsable de la formación de fialides y conidios (Shivanna et al. 2009).

Asimismo, en otros estudios, utilizando concentraciones de EMS que variaron de 2mg a 10mg durante 30 y 60 minutos a temperatura de $32 \pm 2^\circ\text{C}$, utilizando una concentración de 10^6 , las células se centrifugaron a 3000rpm por 10 minutos a 4°C y se lavo con buffer de fosfatos pH7, se reportó el incremento de proteasas en mutantes de *Aspergillus niger* (Radha et al. 2012),

En una concentración de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ de EMS se prepararon diluciones de 50, 100, 150, 200 y 250 tratadas durante 30 minutos a 37°C en baño de agua con agitación, incremento en la actividad enzimática de alfa amilasa en mutantes del hongo *Alternaria tenuissima* FCBP-252 (Shafique et al. 2009).

En estudios similares, se ha inducido mutación para incrementar la producción de lovastatina en el hongo *Aspergillus terreus* donde se encontró un rendimiento de 663µg/ml de lovastatina lo que resulto en un 84.17% más alto que la cepa silvestre, 5mL de suspensión de esporas fue agregada a 15 mL de una solución de EMS (3mg/ml), se mantuvo en agitación a 28°C durante 120 min, durante este periodo se tomaron alícuotas de 2ml en intervalos de 30, 60, 90, 120 y 150 min. Las alícuotas fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos (Sreedevi et al. 2011).

Se incrementó la producción de Ciclosporina “A”, en nueve aislados de *Aspergillus terreus*, donde se mostró un incremento del 885% en la producción de la droga respecto a la cepa silvestre, usando cuatro concentraciones de EMS, 50, 100, 200 y 300 µg/ml, se utilizaron 5 ml de suspensión conidial (10^5 conidia /ml) con 5 ml de cada concentración de EMS durante 30 min a 37°C, los tubos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 60 seg. (Irum and Anjum 2012).

En especies de hongos entomopatogenos como *Metarhizium anisopliae* se han realizado mutaciones inducidas por EMS para incrementar la producción de destruxinas, donde se observó que la producción de destruxinas aumentó en 1.39 - 6.18 veces mas (Hsiao and Ko 2001).

Otros reportes se refieren a la obtención de mutantes de *Penicillium chrysogenum* que produjeron altas cantidades de antibiótico la suspensión fue centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos, el pellet fue lavado con agua destilada

estéril y resuspendida en 2ml de buffer (0.5M), 0.01ml de suspensión de esporas fue transferida a tubos que contenían 1mg por ml de EMS (Veerapagu et al. 2008).

2.7 Características generales de las arcillas

La producción de conidios es clave en la utilización de un insecticida microbial. En general, los conidios de hongos entomopatógenos se aplican en rangos de 2×10^{12} conidios/ml en 2-3 litros de formulación/ha lo que equivale a aplicar 46×10^{12} conidios/ha, por lo que es necesario producir grandes cantidades de hongo (Prior et al. 1992). Se han utilizado arcillas para la formulación de hongos entomopatógenos (Auld 1992) ya que incrementa la longevidad en almacenamiento por permitir el secado del conidio (Moore y Higgins 1997). El empleo de la arcilla como producto desecante, está fundamentado por sus propiedades físico-químicas y la alta capacidad de adsorción de humedad de este mineral. Un desecante es un agente deshidratante el cual adsorbe la humedad de la atmósfera, y retiene las moléculas de agua en su interior. Su función principal es proteger sobre los daños ocasionados por la humedad del aire o de alguna otra sustancia. De acuerdo a la FAO las arcillas son partículas muy finas y forman barro cuando están saturadas de agua. Los suelos arcillosos son pesados, no drenan ni se desecan fácilmente y contienen buenas reservas de nutrientes. En México, se utilizan formulaciones en polvo humectable de *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Broun & Smith utilizando diatomita como inerte. Las arcillas constituyen casi el 70% de la corteza terrestre, son sustancias terrosas formadas principalmente por silicatos aluminicos con materia coloidal y fragmentos de rocas, que se han formado mediante la desintegración de las rocas aluminicas. Consistente en mezclas de distintos minerales, esencialmente silicatos hidratados de aluminio, hierro o magnesio, junto a diversas impurezas, generalmente se encuentran en forma de partículas cristalinas extremadamente pequeñas y en proporciones variables. (Laszlo 1990) **(Figura 12)**

3 HIPÓTESIS

Es posible obtener cepas mutantes de *Hirsutella citriformis* mediante el agente químico metanosulfonato de etilo que tengan mejoramiento en la producción de conidios, velocidad de germinación y virulencia contra *Diaphorina citri*.

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Obtener un banco de mutantes de *Hirsutella citriformis* mediante el tratamiento con Metanosulfonato de etilo que presenten características mejoradas de producción de conidios y velocidad de germinación así como, conservar la patogenicidad contra *Diaphorina citri*.

4.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar ocho cepas silvestres de *Hirsutella citriformis* en base a velocidad de crecimiento radial, velocidad de germinación y producción de conidios.
2. Seleccionar al menos una cepa silvestre de *Hirsutella citriformis* para posteriormente someterla a mutación con Metanosulfonato de etilo.
3. Verificar el número de núcleos presentes en la cepa seleccionada antes de ser sometida a mutación.
4. Seleccionar un sustrato sólido conveniente para obtener la mayor producción de conidios que serán utilizados en la mutagénesis y para comparación posterior con las mutantes.
5. Estandarizar un protocolo de mutación variando tiempos y concentraciones de metanosulfonato de etilo.
6. Caracterizar las cepas mutantes obtenidas respecto a las características de interés y comparar con la cepa silvestre.

7. Realizar bioensayos en laboratorio contra adultos de *Diaphorina citri*, utilizando la mejor cepa mutante y la cepa silvestre y comparar los resultados de mortalidad.

5. JUSTIFICACION

El Huanglongbing o “HLB” se ha vuelto cada vez más preocupante ya que puede afectar seriamente a las distintas variedades de cítricos establecidas en los 23 estados del país. El HLB actualmente se encuentra en 15 de los 23 estados citrícolas (Campeche, Colima, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Quintana Roo, Sinaloa, Yucatán, Chiapas, Veracruz, San Luis Potosí, Hidalgo y Baja California Sur). (López-Collado 2011.)

Los cítricos constituyen un producto agrícola básico en México, siendo fuente de empleo y de ingresos en zonas rurales y forman parte de la dieta de la población. Se estima que de la actividad citrícola dependen más de 90,000 familias mexicanas quienes desarrollan su actividad en 505 mil hectáreas aproximadamente. Los cítricos de mayor importancia en México son: la naranja, tangerinas, limas, limón ácido (limón mexicano, italiano y limón persa) y toronja.

México ha pertenecido tradicionalmente al grupo de los países productores líderes de cítricos en el ámbito internacional, incluso ha subido del sexto lugar en 1979 (siguiendo a Estados Unidos, Brasil, Japón, España e Italia) y al quinto en 2000 ubicándose después de Brasil, Estados Unidos, China y España.

Por tal motivo, es importante encontrar un método efectivo para el control de dicha enfermedad, ya que causa inevitablemente la muerte productiva de las plantas en un período máximo de ocho años, una vez infectadas, dependiendo de la edad y condiciones de cultivo. Una estrategia para combatir el establecimiento y dispersión de la enfermedad en áreas libres del fitopatógeno, consiste en reducir significativamente las poblaciones del insecto vector.

Debido a la presencia en México del vector del HLB, el liviido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*), y al hongo entomopatógeno *Hirsutella* sp. causando micosamiento sobre el vector, sugiere que este último puede ser utilizado como agente de biocontrol.

Sin embargo, el lento crecimiento, el tiempo necesario para la producción de conidios y la reducida cantidad de éstos son factores que pueden limitar el uso de *Hirsutella citriformis* como agente de biocontrol. Estas características pudieran ser mejoradas mediante la realización de mutaciones. Así, mediante estas tecnologías pudiera permitir contar con cepas de *Hirsutella citriformis* de mayor velocidad de crecimiento, con producción de conidios incrementada y conservando su virulencia contra el vector.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Obtención de las Cepas de *Hirsutella citriformis*

Las cinco cepas monoconidiales de *Hirsutella citriformis* fueron donadas por el INIFAP a través del Dr. Raúl Rodríguez Guerra (INIFAP, Campo General Terán, Nuevo León) y son las siguientes: INIFAP-Hir 1 (Tabasco), INIFAP-Hir 2 (Yucatán), INIFAP- Hir 4 (Xolol) INIFAP- Hir 5 (Quintana Roo), INIFAP -Hir 6 (Campeche), INIFAP- Hir 7 (Chiapas). Además, se contó con 2 cepas más que fueron aisladas por la Dra. Orquídea Pérez González IB-Hir-1 (Veracruz), e IB-Hir-2 (Colima) y se encuentran en la colección del Instituto de Biotecnología FCB-UANL

6.2. Medios de Cultivo para el crecimiento de *Hirsutella citriformis* e incubación

Se usó medio papa dextrosa agar (PDA) para todos los cultivos y subcultivos de las cepas de *Hirsutella citriformis*. Se cortó un cuadro de agar de

aproximadamente 1x1cm de cada una de las cepas y se incubaron a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 6 semanas.

6.3. Resiembra y conservación a largo plazo de la cepa de *Hirsutella citriformis*

Se agregó 1 ml de agua destilada estéril, en viales de polipropileno. Se tomó un cuadro de 1x1 cm de un cultivo en PDA con 6 semanas de crecimiento y se suspendieron en viales con agua estéril para conservación en refrigeración.

6.4. Selección de la cepa silvestre para la mutación

Se analizaron los siguientes parámetros de cada cepa para de allí seleccionar la cepa con las mejores características.

Parámetros analizados:

6.4.1. Tasa de crecimiento radial.

Se midió el crecimiento radial de cada una de las cepas colocando un círculo de 0.5cm del cultivo de 2 semanas en el centro de una caja con agar papa dextrosa y se incubaron a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. El crecimiento radial de cada colonia fue medido una vez a la semana usando dos diámetros cardinales previamente dibujados en la parte reversa de cada caja Petri como referencia desde el día ocho hasta que cubrió completamente la superficie de la placa. Se incluyeron 5 repeticiones para cada una de las cepas.

6.4.2. Tiempo para producción de conidios.

A las placas Petri con los cultivos de *Hirsutella citriformis* se le hicieron observaciones diarias en el microscopio estereoscópico y óptico durante 1-6 semanas para determinar el tiempo necesario para la formación de fiálides y conidios.

6.4.3. Cantidad de conidios.

A partir de un cultivo en medio PDA más extracto de levadura al 0.5% incubadas en el laboratorio a $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5 semanas, se adicionaron 10 mL de agua destilada estéril y se raspó la superficie de la caja con un asa bacteriológica, para el desprendimiento de los conidios. Se realizó el recuento de conidios en cámara de Neubauer. Se realizaron 5 repeticiones de cada cepa.

6.4.4. Velocidad de germinación de conidios.

Se realizó primero una suspensión de conidios en agua estéril. Posteriormente se tomaron alícuotas de 100 μl y se sembraron por triplicado en cajas Petri con PDA, las cuáles se incubaron a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y cada 24 horas se cortaron fragmentos de 1cm^2 del medio, se agregó una gota de azul de lactofenol para observar la germinación. Se realizaron observaciones bajo el microscopio y se determinó el porcentaje de conidios germinados, para esto se contaron 100 conidios y se registró el número de conidios germinados. Se consideró conidio germinado aquel que presentara la longitud del tubo germinativo de al menos el tamaño del conidio.

6.4.5. Análisis Estadístico del crecimiento radial y producción de conidios

Las medias del crecimiento radial medido en cm y las medias de la producción de conidios/ml se analizaron mediante un diseño de ANOVA completamente al azar con cinco repeticiones. Se realizó después una comparación de medias mediante Tukey ($p\leq 0.05$) usando el paquete estadístico descrito por Olivares-Saenz (1994).

6.5. Verificación del número de núcleos presentes en las cepas

Para la tinción de núcleos se preparó una solución en agua destilada esteril de safranina O al 0.5% e hidróxido de potasio al 3%. (Sneh et al. 1991). Por separado cada uno. Se toma un volumen de 5µl de suspensión de conidios y se coloca sobre un portaobjetos, después se agrega simultáneamente la safranina y el KOH 5µl de cada uno. Posteriormente se coloca el cubre objetos y se observa bajo el microscopio.

Nota: La safranina O (Colorante catiónico), colorea el núcleo celular de rojo, pero no reacciona con los otros componentes nucleares, se combina con constituyentes cargados negativamente. La safranina es conocida como dimetil safranina, cuya fórmula molecular es (C₂₀H₁₉N₄Cl). El hidroxido de potasio (KOH), permite ver elementos del hongo ya que el KOH digiere parcialmente los componentes proteicos, por ejemplo de la célula huésped pero no actúa sobre los polisacáridos de las paredes celulares del hongo.

6.6. Producción de conidios en sustratos vegetales para mutagénesis

6.6.1 Cultivo Bifásico

Para la obtención de un mayor número de conidios se cultivaron las cepas en medio líquido (casaminoácidos) para después aplicarlo sobre 3 tipos de sustratos vegetales (sorgo, arroz y avena) y determinar las concentraciones de conidios producidos.

6.6.1.1. Producción del Inóculo en cultivo líquido

Las cuatro cepas INIFAP-Hir-2, INIFAP-Hir-1, IB-Hir-1 y IB-Hir-2 se sembraron en PDA más extracto de levadura (0.5%) fueron incubadas durante seis semanas a $25 \pm 2^\circ$ C para utilizarse como inóculo. Para esto se cortaron 5 cuadros de 1cm² del cultivo en agar y se colocaron dentro de cada matraz

Erlenmeyer con capacidad de 250 ml, el cual contenía 50 mL del medio líquido de casaminoácidos, descrito por Jackson et al. (1997) compuesto por $g L^{-1}$: 2.0 KH_2PO_4 , 0.4 $CaCl_2$, 0.3 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 80 glucosa y 25 casaminoácidos (Difco); además, contenía en $mg L^{-1}$: 37 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 50 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 16 $MnSO_4 \cdot H_2O$, 14 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, ajustado a pH 5.7, previamente esterilizado por 20 minutos a $121^\circ C$. Posteriormente se incubó el cultivo a temperatura de $25 \pm 2^\circ C$ y en agitación a 250 rpm por 7 días en un agitador rotatorio (LabTech Modelo LSI-3016A). Al final de la incubación se tomaron 15 ml de cada suspensión para inocular los tres sustratos sólidos (sorgo, arroz y avena).

6.6.1.2. Sustratos

Los granos (sorgo, arroz y avena) fueron seleccionados en base a los reportes de Ye et al. (2006); Figueroa et al. (2007) y Sahayaraj et al. (2008) como excelentes sustratos y con la humedad deseada para formación de conidios.

El arroz se lavó para remover el almidón presente, posteriormente se precoció con la adición de 20 mL de aceite y 300 mL de agua por 500g de arroz seco. El precocinar el arroz evita la formación de grumos durante la esterilización. Posteriormente se colocaron 50g de arroz en cada recipiente, se esterilizaron en autoclave a $121^\circ C$ por 40 minutos (adaptado de Arzumanov et al. 2004). La avena se mantuvo en remojo durante 12 horas de acuerdo a la metodología reportada por Figueroa et al. (2007), para esto se pesaron 50 gramos de avena que se depositaron en frascos de vidrio de boca ancha con tapa de aproximadamente 500 gramos de capacidad conteniendo 200 mL de agua destilada, a las 12 horas el agua fue drenada por decantación para así proseguir a la esterilización en autoclave a $121^\circ C$ por 20 minutos por dos días consecutivos, los frascos fueron agitados para despegar los granos aglomerados. Para la preparación del sorgo se siguió la metodología de Sahayaraj et al. (2007). Se colocaron 50 gramos de cada sustrato también en frascos de vidrio de boca ancha con tapa, se agregó 200 mL de agua destilada a cada recipiente donde se

mantuvieron por 24 horas, posteriormente el exceso de agua se drenó por decantación y se esterilizaron en autoclave a 121°C, por 20 minutos. Los tres sustratos fueron inoculados con 10 ml del cultivo. Posterior a la inoculación, los frascos fueron incubados a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 días, de donde se tomaron muestras de 1g cada ocho días, para verificar la cantidad de conidios formados. De cada sustrato se prepararon 5 repeticiones.

6.6.1.3. Conteo de conidios

Para determinar la producción de conidios en los diversos sustratos, se extrajo un gramo de cada sustrato y se colocó en un tubo Falcón, el cual contenía 9 ml de agua destilada, se agitó en vortex durante un minuto y posteriormente se contaron los conidios producidos colocando una alícuota en la cámara de Neubauer (Hausser Scientific), y se observó al microscopio.

6.6.1.4. Análisis Estadístico

Los datos de las medias de la producción de conidios fueron analizados mediante ANOVA en un diseño estadístico bifactorial de 4x3 (cepa x sustrato) seguido de comparación de medias mediante Tukey ($p \leq 0.05$) usando el paquete estadístico descrito por Olivares Saenz, (1994).

6.6.2. Cultivo en arroz y avena y dos tipos de recipientes (vidrio y plástico)

6.6.2.1. Inóculo

El inóculo empleado para la siembra en los sustratos se preparó partir de un cultivo monospórico del hongo en PDA más extracto de levadura (1%), con abundante crecimiento de sinemas (alrededor de seis semanas), se adicionaron 10ml de agua destilada estéril a cada caja y se realizó un raspado para el desprendimiento de los conidios, después se tomaron 20 μl de esta suspensión para el recuento de conidios en la cámara de Neubauer. Posteriormente se ajustó

la concentración a 2.5×10^6 conidios/ml empleando agua destilada estéril. De esta suspensión se tomaron 15ml para inocular los dos tipos de recipientes (vidrio y plástico) y el arroz y avena, los cuales fueron procesados en la forma ya descrita anteriormente. La evaluación de la producción de conidios se realizó también de la misma manera tomando 1 g de muestra de cada uno. Se usaron 5 repeticiones para cada tipo de recipiente y cada sustrato.

6.6.2.2. Análisis Estadístico

Las medias de cada tratamiento fueron analizadas mediante ANOVA en un diseño bifactorial 2x2 (sustrato X recipiente) seguido de comparación de medias mediante Tukey ($p \leq 0.05$) usando el programa estadístico Minitab 17 (2010).

6.7. Preparación de la suspensión de conidios para la mutagénesis.

Se preparó una suspensión de conidios de la cepa INIFAP-Hir-2 seleccionada de concentración 1×10^7 conidio/ml, la cual fue sometida al proceso de mutagénesis.

6.8. Mutación de *Hirsutella citriformis* con el agente químico metanosulfonato de etilo.

Para esto ya se tenían datos de cuál de las cepas sería la más conveniente para someterla al procedimiento de mutación. El mutageno elegido fue metanosulfonato de etilo (Wako Pure Chemical Industries Co.) Ya que reacciona directamente con el ADN produciendo mutaciones al azar y es un método rápido de obtener mutantes. Como primer paso se procedió a preparar la solución stock del agente.

6.8.1. Preparación de la solución stock de EMS

Se utilizó una concentración inicial de 30,000 µg/ml en agua destilada estéril. El procedimiento se realizó en una cámara de extracción de humos y utilizando el equipo protector (guantes, lentes y tapabocas). Posteriormente se esterilizó por filtración en membrana Millipore de 0.2 micras y de esta solución stock se prepararon diferentes diluciones en agua destilada estéril.

Es importante conocer la dosis a utilizar del agente mutagénico porque así se conocerá la sensibilidad de los conidios al ser expuesto y se tomará aquella dosis a la cual la supervivencia de los conidios disminuye respecto al control sin tratar.

6.8.2. Pruebas con diferentes concentraciones y tiempos de exposición con el EMS.

Para desarrollar cepas mutantes con EMS, se tomaron alícuotas de 1 mL de la suspensión de conidias (10^7 conidias/mL) las cuales fueron colocadas en tubos Eppendorf (2 mL). Los tubos fueron centrifugados a 8000 rpm por 15 min. El pellet fue lavado dos veces con buffer de fosfatos 0.1M (pH7) y resuspendido en el mismo buffer. Un volumen apropiado del mutagéno fue agregado para obtener diferentes concentraciones (50, 300, 500, 1000, 2000, 5 000 y 10 000 µg/ml). Se realizaron ensayos por triplicado en cada concentración. Las suspensiones fueron incubadas en agitación a $25\pm 2^\circ\text{C}$ durante 30 y 60 minutos para las primeras tres concentraciones y 60 y 180 minutos para las últimas cuatro concentraciones. Después de la incubación se tomaron 100 µL de cada una y se agregó a un tubo Eppendorf conteniendo 900 µL de una solución de tiosulfato de sodio al 6% para la inactivación del EMS (Fujimora 1998), se agitó y se incubó por 30 minutos más. Las esporas fueron cosechadas por centrifugación y lavadas dos veces con agua destilada estéril, se tomaron 20 µL de esta suspensión y fueron transferidos a cajas Petri con medio PDA con 1% de extracto de levadura, donde se sembraron por estría y se incubaron a la temperatura ya mencionada. Las colonias sobrevivientes se observaron, se contaron, y se registraron. Cada

colonia sobreviviente se tomo y se sembró individualmente en cajas con el mismo medio. Las colonias obtenidas con los diferentes tratamientos del EMS (concentración y tiempo) se seleccionaron en base a una diferencia significativa en el número de colonias sobrevivientes en relación al control.

6.8.3. Estabilidad de las cepas

La estabilidad de las colonias mutantes se evaluó mediante subcultivos sucesivos en Agar PDAY (1%) durante cuatro rondas de esporulación.

6.8.4. Parámetros de cepas mutantes analizados

Se midió el crecimiento radial de cada una de las cepas mutantes, producción de conidios y velocidad de germinación utilizando la misma metodología descrita para las cepas silvestres analizadas inicialmente (puntos 6.4.1 a 6.4.5).

6.9. Microcultivo

Se cortaron cuadros de 1 cm² del medio PDAY 1%, posteriormente se colocaron tres cuadros por cada portaobjetos, el cual se ubicó dentro de una placa Petri y se sostuvo con ayuda de una varilla de vidrio delgada bajo condiciones asépticas; para obtener las condiciones de humedad, se colocaron 5 mL de agua destilada estéril en la base de la caja Petri. Se inocularon las cuatro esquinas de cada cuadro de agar con una alícuota de la suspensión conidial de 1×10^6 , posteriormente se colocó un portaobjetos estéril sobre cada cuadro de agar inoculado. Las placas fueron mantenidas a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A los 15 días se separó cuidadosamente el cubreobjetos del bloque de agar depositándolo sobre otro portaobjetos que contenía una gota del colorante azul de lactofenol por cada cuadro de agar, se selló cada cubreobjetos con esmalte de uñas transparente para así realizar observaciones y mediciones en el microscopio óptico con un objetivo de 40x.

6.10. Bioensayos contra adultos de *Diaphorina citri*

Para realizar los bioensayos se seleccionó la mutante con clave 53-10 en base a los resultados mostrados en cuanto a la producción de conidios, crecimiento radial y germinación, así como la cepa silvestre para la comparación de resultados. El inóculo empleado para los bioensayos se obtuvo a partir de cultivos esporulados en medio PDAY al 1% e incubada a temperatura de ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 6 semanas.

6.10.1. Recipientes utilizados para el bioensayo

Los bioensayos se realizaron en arena experimental como se describió previamente por Pérez-Gonzalez, et al. (2015). Se colocó una esponja dentro de cada recipiente de plástico con capacidad de 150 ml posteriormente se agregó agua destilada esteril para mantener condiciones de humedad y sobre ésta se colocaron hojas tiernas de cítricos cambiándolas cada tercer día. A la tapa del recipiente se le realizó un corte circular el cual fue cubierto con una tela de malla para la oxigenación. (Figura 13).

6.10.2. Obtención de insectos adultos de *Diaphorina citri*

Los insectos adultos de *D.citri* se colectaron de un vivero ubicado en las instalaciones del Campo Experimental General Terán del INIFAP, en el estado de Nuevo León, México. La colecta se realizó con ayuda de un aspirador bucal adaptado a un depósito de plástico transparente, los insectos una vez capturados fueron transportados al laboratorio, donde aquellos que presentaban apariencia sana fueron seleccionados para los bioensayos y se descartaron los enfermos, o dañados durante la colecta. Posteriormente fueron anestesiados usando un algodón impregnado con 80 μL de cloroformo colocado y sujeto a la parte superior del depósito donde fueron colectados para inmovilizarlos y realizar las aplicaciones de los tratamientos.

6.10.3. Procedimiento de bioensayo

Se formaron 3 grupos de 60 insectos dentro de recipientes de plástico con capacidad de 250mL. Cada grupo de insectos adormecidos fueron colocados sobre colonias esporuladas de la cepa mutante donde se mantuvieron por aproximadamente un minuto. Una vez finalizado el tiempo se tomaron grupos de 12 insectos con ayuda de un pincel y fueron colocados dentro de los recipientes anteriormente mencionados. Adicionalmente se estableció un grupo de insectos inoculados de la misma manera con la cepa silvestre y un testigo sin inocular que también se sometió a cloroformo. Los tres tratamientos se establecieron con cinco repeticiones, para un total de 180 insectos/tratamiento y fueron incubados dentro de una cámara bioclimática a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $76 \pm 4\text{HR}$ y 16:8 horas de luz: oscuridad. La mortalidad de los insectos fue evaluada cada tercer día; se contaron los insectos muertos y se colocaron en un ambiente húmedo (**Figura 14**) para favorecer el micosamiento externo y poder comprobar la infección por el hongo.

6.10.4. Análisis Estadístico del Bioensayo.

Los valores registrados de insectos muertos fueron sometidos a un análisis de varianza completamente al azar seguido de una prueba Tukey ($p \leq 0.05$) para diferenciación de las medias mediante el programa estadístico Minitab 17 (2010)

6.11. Elaboración de medios líquidos para producir biomasa y formulados secos

6.11.1 Preparación del Inóculo

La cepa silvestre INIFAP-Hir-2 crecida en medio PDAY 1% con 6 semanas de incubación a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ fue utilizada como inóculo, colocando dentro del matraz la mitad de la cepa en cortes muy finos con ayuda de un bisturí.

6.11.2. Precultivo

El medio líquido para el precultivo contenía las siguientes sales basales en g L^{-1} : 4.0 KH_2PO_4 , 0.8 CaCl_2 , 0.6 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 FeSO_4 además, contenía en mg L^{-1} : 37 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 16 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 14 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; y 500 μg de cada uno de tiamina, riboflavina, niacina, pantotenato piridoxamina, Acido tióctico y 50 μg de ácido fólico, biotina y vitamina B12 (Jackson et al. 1997). El precultivo además fue suplementado con glucosa a 25 g L^{-1} (40% carbón [C]) y caseína hidrolizada 10 g L^{-1} (8% nitrógeno [N] y 40% [C]). El precultivo tuvo un pH de 5.8, el cual no fue ajustado durante la fermentación.

La solución stock de glucosa (20%) fue esterilizada separadamente. La esterilización de los precultivos y las soluciones stock de glucosa fue a 120°C por 20 minutos. El inóculo para el precultivo líquido fue hecho colocando dentro del matraz la mitad de la cepa en cortes muy finos con ayuda de un bisturí. El precultivo se hizo crecer en 100ml de medio en matraces bafleados de 250ml a 28°C y 300rpm durante 4 días en una incubadora con agitación (INNOVA 4000, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). Los matraces además fueron agitados manualmente para bajar el crecimiento miceliar que se queda sobre las paredes de los matraces. Se tomaron 5 ml para los cultivos siguientes:

6.11.3. Cultivos para evaluar la producción de biomasa de *Hirsutella citriformis*.

Los seis medios líquidos usados para producir biomasa se muestran en la **Tabla 4** con las cantidades variables de C y N. Todos contenían las siguientes sales basales en g L^{-1} : 4.0 KH_2PO_4 , 0.8 CaCl_2 , 0.6 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 FeSO_4 además, contenía en mg L^{-1} : 37 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 16 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 14 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; y 500 μg de cada uno tiamina, riboflavina, niacina, pantotenato piridoxamina, Acido tióctico y 50 μg de ácido fólico, biotina y vitamina B12 (Jackson et al., 1997) y además varias combinaciones de glucosa y caseína hidrolizada (Casaminoácidos, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). La cepa INIFAP-Hir-2

se hizo crecer en 50 ml del medio en matraces bafleados de 250ml a 28°C y 300 rpm durante 7 días en una incubadora con agitación (INNOVA 4000, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). Los matraces además fueron agitados manualmente para bajar el crecimiento miceliar que se queda sobre las paredes de los matraces.

Las concentraciones de carbón y la proporción C: N fueron calculados en base a que hay un 40% carbón en glucosa y 8% nitrógeno en caseína hidrolizada. Al séptimo día de agitación se tomaron muestras para medir la biomasa, el experimento fue repetido al menos en dos ocasiones.

6.11.4. Determinación de Biomasa

Para la evaluación de biomasa se extrajo 1 ml de muestra del cultivo recolectado del matraz, la biomasa fue separada por filtración al vacío sobre discos de papel filtro pre pesado. El peso seco de la biomasa acumulada fue determinado por el secado de la muestra sobre el papel filtro a 60°C durante una noche, tomando el peso hasta peso constante.

6.11.5. Evaluación de germinación

Después del crecimiento del cultivo de INIFAP-Hir-2 por 7 días se realizaron pruebas de germinación, pero solamente a los cultivos 4, 5 y 6. Se colocaron 7 gramos de cada arcilla (**Tabla 5**) dentro de una caja petri a la cual se agregaron 5ml de cultivo; se mezclaron vigorosamente con ayuda de una espátula hasta observar una mezcla homogénea realizando dos replicas por cada cultivo y arcilla (**Figura 12**), las muestras fueron colocadas dentro de una cámara húmeda y secados toda la noche (**Figura 15**). El contenido de humedad de la mezcla fue determinada con un analizador de humedad (Mark II, Denver Instruments, Arvada, CO, USA). Cuando la formulación de INIFAP-Hir-2 tuvo un porcentaje $\leq 5\%$, fueron empacadas al vacío en una bolsa de polietileno con el equipo Multivac C 100, (Sepp Haggemuller, Wolfertschwenden, Germany) y almacenado a 4°C. Al siguiente día se colocaron 25 mg de la formulación

esparcidos sobre cajas petri con agar agua. Dos cajas de agar agua fueron usadas por cada tratamiento, incubadas a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 días , cada 24 horas se evaluaron en un estereoscopio (**Figura 16**) (Olympus, model SZH10, Planapo objetivo 1X) 100 granos del formulado de cada caja Petri para observar la germinación de las hifas la cual fue tomada como medida de viabilidad.

6.11.6. Análisis Estadístico

Los datos de germinación fueron expresados como promedio \pm DE y sometidos a un análisis de varianza y prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) utilizando el software Minitab versión 17 (2010).

6.12. Evaluación de medios con diferentes fuentes de nitrógeno

Para mejorar la producción y rendimiento de la cepa INIFAP-Hir-2 tolerante a la desecación, se realizó una comparación de medios de cultivo líquido suplementados con fuentes de nitrógeno complejas.

6.12.1 Precultivo

Se preparó un precultivo mencionado anteriormente, compuesto del medio de sales basales suplementado con trazas de metales y vitaminas (Jackson *et al.*, 1997). El precultivo además fue suplementado con glucosa a 76 g L^{-1} (40% carbón [C]) y caseína hidrolizada 15 g L^{-1} (8% nitrógeno [N] y 40% [C]) así, el medio tenía una proporción de carbón-nitrógeno (C: N) de 30:1 y carbón [36g]. El precultivo tuvo un pH de 5.8, el cual no fue ajustado se mantuvo en agitación por 4 días.

6.12.2. Preparación de medios con diferente fuente de nitrógeno

Se prepararon seis medios de cultivo compuestos del medio de sales basales suplementado con trazas de metales y vitaminas (Jackson *et al.* 1997). Además con una fuente de carbono (glucosa 36 g). Se eligió esta concentración en base al mejor resultado obtenido para producción de biomasa en el ensayo

anterior, que fue: Medio con 36g de Glucosa y proporción de carbón-nitrógeno (C: N) de 10:1, pero ahora modificando la fuente de nitrógeno, donde se utilizaron 6 fuentes distintas de nitrógeno mostradas en la **Tabla 6**.

Los medios con las nuevas fuentes de nitrógeno fueron inoculados, incubados y el peso seco producido y secado en las mismas condiciones que para el ensayo anterior (Temperatura 28°C, agitación 300 rpm durante 7 días y después una muestra de 1 g fue filtrada con vacío sobre papel filtro y secada a 60°C por 24 horas). Cada dos días se hicieron observaciones al microscopio para visualizar el crecimiento del micelio y/o ver alguna posible contaminación.

6.12.3 Evaluación de germinación

Al finalizar los 7 días de incubación de INIFAP-Hir-2 se combinaron 3 matraces de cada tratamiento. Se colocaron 21 gramos de arcilla (Attapulguita Georgia, granulometría de -325 de volatilidad regular) dentro de una caja petri grande en el cual se agregaron 18ml de cultivo y fueron procesadas de la misma manera que el procedimiento mencionado en el punto 6.11.5.

6.12.4 Producción de conidios en la arcilla Attapulguita Georgia.

Se realizó la evaluación a los 12 días de incubación del formulado sobre cajas petri con agar agua, agregando 7 ml de agua destilada a la caja petri arrastrando con ayuda de una espátula esteril todos los gránulos. Se midió el volumen recolectado se vació en un tubo de vidrio y se agito la suspensión obtenida en un vortex, y la concentración de conidios fue medida usando un hematocitometro y el número total de conidios por caja fue calculado.

Para determinar el número de conidios producido por gramo de preparación seca, el número de conidios cosechados fue dividido entre el peso de la preparación seca agregado a cada caja con agar agua (0.025g)

6.12.5. Análisis Estadístico

Los datos de producción de conidios fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) utilizando el software Minitab versión 17 (2010)

6.12.6. Producción de conidios en diferentes tipos de arcillas.

De los resultados obtenidos en la prueba anterior, usando diferentes fuentes de nitrógeno y colocando posteriormente en arcilla para producción de conidios, se usó el mejor medio de cultivo (con diferente fuente de N) para realizar experimentos de producción de conidios y germinación en 8 diferentes tipos de arcillas, de diferente origen, además de incluir un experimento con tierra de diatomeas (soporte orgánico) las cuales se muestran en la siguiente **Tabla 7**. Los cultivos se prepararon, se cultivaron y se evaluaron de la misma manera que en los puntos anteriores para producción de micelio, evaluación de germinación y de producción de conidios.

7. RESULTADOS

7.1. Crecimiento radial de cultivos de cepas silvestres.

7.1.1. Tasa de crecimiento radial de *Hirsutella citriformis* sobre PDA (Agar papa dextrosa).

Los resultados de la evaluación de crecimiento radial de 8 cepas de *Hirsutella citriformis* mostraron un lento crecimiento ya que tardaron alrededor de 50 días para cubrir totalmente la caja (**Figura 17**), el análisis estadístico determinó que las cepas de INIFAP-Hir-2, IB-Hir-1 e INIFAP-Hir-5 presentaron significativamente la mayor tasa de crecimiento, mostrando valores de 3.63, 3.67 y 3.60 cm respectivamente, a los 50 días en PDA ($F=39.84$; $gl=7,24$; $P\leq 0.0001$).

7.1.2. Tasa de crecimiento radial de *Hirsutella citriformis* sobre PDAY al 0.5%.

Al adicionar extracto de levadura 0.5% se mostró un crecimiento completo de la caja en 35 días (**Figura 18**), lo que disminuyó el tiempo en aproximadamente 15 días; el análisis de varianza determinó que las cepas de INIFAP-Hir-6 e INIFAP-Hir-2 presentaron significativamente la mayor tasa de crecimiento mostrando valores de 3.49 y 3.50cm a los 35 días ($F=6.047$; $gl=7,24$; $P\leq 0.001$).

7.1.3. Comparación de la tasa de crecimiento radial

Cuando se compararon los resultados en cm/día de cada cepa cultivada en los medios PDA y PDAY (con extracto de levadura al 0.5%), mostraron aumento significativo en el crecimiento radial. ($F= 0.14$ $g.l.= 7,24$ $p= 0\leq 0.01$). La tasa de crecimiento radial varió de 0.057 (IB-Hir-2) a 0.073cm /día (INIFAP-Hir-2) en medio PDA, mientras que en medio PDAY al 0.5% varió de 0.084 (INIFAP-Hir-4) a 0.1cm/día (INIFAP-Hir-2, INIFAP-Hir-6) mostrado en la **Figura 19**.

7.2. Producción de conidios de cepas silvestres en medio PDAY 0.5%.

La **tabla 8** muestra la producción de conidios de cepas silvestres en medios de PDA más extracto de levadura al 0.5% a las 5 semanas de incubación donde se observó que la cepa de INIFAP-Hir-2 presentó la mayor producción de conidios y difiere significativamente del resto de las cepas. ($F= 451.19$ $gl=6, 14$; $P\leq 0.01$).

7.3. Porcentaje de germinación de la cepa INIFAP-Hir-2.

Se evaluarón 4 medios para determinar cual muestra su mayor capacidad germinativa. A las 12 horas alrededor de un 20% desarrollaron tubo germinativo a excepción del medio agar-agua que mostró un 10% de germinación, a las 24 horas se observó un 84% de germinación en el medio PDA al 0.5% de extracto de levadura, no mostró diferencia estadística con el medio PDA, a las 36 horas el medio agar-agua mostró diferencia estadística frente a los otros tres medios evaluados mostrando los valores más bajos de germinación, a las 48 horas se alcanzó un 95% de germinación en el medio PDA, no se observó diferencia estadística con la adición de extracto de levadura ($F= 19.72$; $gl= 3,8$; $P\leq 0.001$) por lo cual se seleccionó PDA para las evaluaciones de germinación de todos los experimentos. En la **figura 20** se observan las diferentes etapas de germinación.

7.4. Verificación de número de núcleos presente en la cepa INIFAP-Hir-2.

Los núcleos conservaron su integridad, mostraron forma lenticular y color rojo claro, el método permitió identificar a la cepa INIFAP-Hir-2 como mononucleada. **Figura 22.**

7.5. Selección de un sustrato sólido conveniente para obtener la mayor producción de conidios que serán utilizados en la mutagénesis y para comparación posterior de mutantes.

La producción de conidios en el sustrato sorgo, mostró que la cepa INIFAP-Hir-2 presentó diferencia significativa ($P \leq 0.01$) respecto a las demás cepas con una mayor producción de 7.16×10^6 conidios g^{-1} . Siguiendo IB-Hir-2 con una producción de 6.67×10^6 conidios g^{-1} . INIFAP-Hir-1 obtuvo una producción de 5.5×10^6 conidios g^{-1} e IB-Hir-1 mostró la menor producción con 3.33×10^6 conidios g^{-1} a los 48 días de evaluación. ($F = 48.54$ g.l 3, 8 $P \leq 0.01$) (**Figura 23**)

En la siguiente **Figura 24** se muestra la concentración de conidios obtenidos en el sustrato avena, a los 48 días de inoculación, para las cepas INIFAP-Hir-2 e IB-Hir-2 se obtuvo una producción promedio de 8.58×10^6 y 9.33×10^6 respectivamente, sin embargo no mostraron diferencias significativas entre ellas ($P \leq 0.05$) pero sí frente a las cepas IB-Hir-1 e INIFAP-Hir-1 que mostraron 5.58×10^6 y 6.25×10^6 respectivamente. ($F = 22.43$ g.l 3, 8 $P \leq 0.01$).

En el sustrato arroz (**Figura 25**) las cepas mostraron diferencias. IB-Hir-2 no produjo conidios en el sustrato arroz, A los 48 días la cepa INIFAP-Hir-1 mostró una producción de 7.58×10^6 conidios g^{-1} mostrando diferencia significativa respecto a la cepa IB-Hir-1 que presentó 6.08×10^6 conidios g^{-1} e INIFAP-Hir-2 con 5.83×10^6 conidios/g. ($F = 39.79$ g.l 3, 8 $P \leq 0.01$)

En base a los resultados anteriores se eligió el sustrato avena debido a que presentó la más alta producción de conidios y confirmando que la cepa INIFAP-Hir-2 produce las concentraciones más altas de conidios.

7.6. Selección de un sustrato y recipiente conveniente

La producción de conidios de la cepa INIFAP-Hir 2 fue significativamente más alta en avena que en arroz, para los 4 días de muestreo: (7, 14, 21 and 28 días): Día 7 (F=10.0059; g.l= 1,8; P(sustrato): 0.013, P(recipiente): 0.042; P(interacción): 0.231; día 14 (F= 276.7806; g.l= 1,8; P(sustrato)>0.001; P(recipiente)=0.046; P (interacción)=0.700; día 21 (F= 139.0674; g.l= 1,8; P (sustrato)<0.001, P(recipiente)=0.341; P(interacción)=0.056; día 28 (F= 68.2467; g.l= 1,8; P (sustrato)<0.001; P(recipiente)=0.016; P(interacción)=0.786. Para esta fecha, 28 días, se alcanzó la mayor producción de esporas (52.76×10^6 conidios/g). Para el factor contenedor, se mostraron también diferencias significativas en la producción de conidios, donde el recipiente de plástico resultó mejor que el de vidrio excepto en la medición del día 21, donde se encontró diferencia significativa para el recipiente de vidrio (**Figura 27**).

7.7. Protocolo de mutación variando tiempos y concentraciones de metanosulfonato de etilo para obtención de mutantes.

A los 15 días se observa el desarrollo de colonias (**Figura 28**), la selección fue en base a su supervivencia, obteniéndose un total de 63 colonias (**Tabla 9**). En este experimento se observaron diferencias significativas en la obtención de colonias mutantes después de la exposición a las diferentes concentraciones y tiempos del EMS. Se encontraron cambios morfológicos y fisiológicos significativos en las concentraciones de 5 000 $\mu\text{g/ml}$ y 10 000 $\mu\text{g/ml}$ y tiempos de exposición de una y tres horas. Después de una exposición a 10 000 $\mu\text{g/mL}$ por tres y una hora mostró 6% y 25% de supervivencia respectivamente. El tratamiento a 5 000 $\mu\text{g/ml}$ por tres horas presentó 43% de supervivencia (**Figura 29**). Las mutantes mostraron fenotipos diversos así como variaciones en las características morfológicas.

7.8. Caracterización de colonias mutantes en base a crecimiento radial, producción de conidios y velocidad de germinación.

7.8.1. El crecimiento radial

Las cepas 103-15, 103-17, 101-19, 101-21, 101-23 y 51-11 mostraron diferencias significativas respecto a la mutante 53-10 y al control (**Figura 30**), siendo esta última cepa la que mostro la mayor diferencia con un crecimiento de 0.21 cm/día respecto a la cepa silvestre que mostro 0.16 cm / día en PDAY 1% (F=125.95; gl = 7, 16; P<0.001). Al mismo tiempo se realizaban observaciones en su capacidad de producir sinemas, es por esto que fueron descartadas muchas de las mutantes obtenidas, ya que no presentaron producción de conidios.

7.8.2. Producción de conidios de cepas mutantes

Respecto a la producción de conidios la cepa que mostro diferencia significativa en relación al control fue la 53-10, con una producción de 7.61×10^6 conidios/ml (F= 172.86; g.l= 4, 25; P<0.001) en cuanto al control mostro una producción de 3.05×10^6 a las seis semanas de incubación en caja Petri en medio de cultivo PDAY 1%. (**Figura 31**)

7.8.3. Velocidad de germinación.

En cuanto a los resultados de velocidad de germinación, a las 24 horas se observó que la cepa mutante 53-10 mostro diferencia significativa respecto a las tres cepas mutadas restantes y diferencia parcial respecto al control (cepa silvestre) (F= 98.49; g.l= 4,25; P≤ 0.0001) mostradas en la **Tabla 10**. Para las 48 horas de incubación, solo 2 cepas mutantes (101-11 y 51-6) mostraron porcentajes de germinación menores y las otras 2 fueron similares a la cepa silvestre.

Se seleccionaron solo aquellas mutantes que mostraron diferencias significativas en su capacidad de esporulación y mantuvieron un crecimiento radial mayor o igual que la cepa silvestre.

Las cepas mutantes que produjeron mayor número de conidios sobre agar (**Figura 31**) fueron posteriormente evaluadas en el sustrato avena (**Figura 37**). A los 14 días y 21 días de evaluación se observó que la cepa mutante 53-10 presentó diferencia significativa ante el restante de las cepas con una producción de 1.95×10^6 (F= 20.04; g.l= 4,10; $P \leq 0.0001$) y 3.34×10^6 (F= 51.26; g.l= 4,10; $P \leq 0.0001$) respectivamente, **sin embargo a los 28** días de incubación comenzó a disminuir la concentración de conidios tanto para la cepa mutante 53-10 (2.71×10^6) como la cepa silvestre (2.87×10^6) no mostrando diferencia significativa entre ellas pero sin frente a las cepas mutantes 101-11 y 51-6 (F= 14.41; g.l= 4, 10; $P \leq 0.0001$) (**Figura 38**).

7.9. Microcultivo

Cuando se realizaron microcultivos (**Figura 39**), se encontró diferencia significativa en el diámetro de los conidios formados por las cepas mutantes 101-11 (6.45 μm), 53-10 (6.99 μm) y 51-6 (6.69 μm) respecto a la cepa silvestre (4.07 μm) y la cepa 103-9 de (3.94 μm). (F= 27.52; g.l= 4,45; $P \leq 0.0001$). (**Figura 40,41**)

7.10. Bioensayos

Los resultados obtenidos en el bioensayo, muestra que la mortalidad de *Diaphorina citri* inicio al tercer día de haber estado en contacto con conidios de *Hirsutella citriformis* tanto de la cepa silvestre como de la mutante, al noveno día en nuestro estudio se obtuvo 84% de mortalidad para la cepa silvestre y 98% para la cepa mutante 53-10. Sin embargo, de acuerdo a los resultados del ANOVA no mostró diferencia significativa en la mortalidad entre mutante y silvestre (F=119.66; g.l=2,6; $P < 0.001$), para los 12 días postinoculación, la mortalidad alcanzo un 94% y 100% para la cepa silvestre y mutante 53-10 respectivamente (F=187.48; g.l=2,6; $P < 0.001$). (**Figura 43**). En nuestro estudio se observó micosamamiento de 60% y 69% a los 12 días de inoculación para la cepa silvestre y mutante 53-10 respectivamente existiendo diferencia significativa (F=

304; g.l= 2, 12; $P < 0.001$). (**Figura 44**). Por otra parte, a los 9 días postaplicación se comenzaron a ver las estructuras típicas de *Hirsutella citrifomis* sobre los insectos muertos (**Figura 45**). Los sinemas de la cepa mutante lucían más gruesos a diferencia de los sinemas de la cepa silvestre que mostraron un aspecto delgado.

7.11. Producción de biomasa de la cepa INIFAP-Hir-2 en cultivo líquido y elaboración de formulados.

Nuestro resultado mostró que para la cepa INIFAP-Hir-2 al séptimo día de la inoculación en el medio suplementado con glucosa a una concentración de 36 g/L y casaminoácidos con una relación 10:1 mostró los mejores rendimientos de biomasa con una producción de 19.47 g/L, estadísticamente fue el único medio con mejor rendimiento que los demás ($F = 17.57$; $g.l = 5,30$; $P \leq 0.0001$). Los valores más bajos de biomasa se encontraron en medios conteniendo una concentración de glucosa (carbono) de 8 g/L con una relación de C:N de 10:1, 30:1, o 50:1, produciendo de 4.6 a 5.3 g/L de biomasa. (**Figura 46**).

Al realizar las pruebas de germinación en dos distintos soportes secos (arcilla 1 y 2), la arcilla que conservó viabilidad fue el aluminosilicato hidratado, mostrando diferencia significativa para los medios con las tres relaciones de C:N (**Figura 47**), por otro lado, la biomasa que provenía de medios con la relación 10:1 mostró el porcentaje de germinación más elevado en ambos soportes a partir del segundo día de evaluación con 34 y 52% comparado con la relación 30:1 (14 y 19%) y 50:1 (12 y 23%).

Una vez que se logró el primer paso para buscar la cantidad adecuada de glucosa y relación C:N favorable para la producción de micelio, se procedió a la evaluación de distintas fuentes de nitrógeno, la fuente de C fue la misma (Glucosa), y como fuente de nitrógeno orgánico se utilizó; casaminoácidos, harina de semilla de algodón, extracto de levadura, harina de soya, polvo de remojo de maíz y como fuente de nitrógeno inorgánico sulfato de amonio. La

mayor concentración de peso seco se obtuvo cuando se utilizó como fuente de nitrógeno la harina de semilla de algodón (51.30 g/L) y harina de soya (48.40 g/L), los cuales mostraron diferencia significativa respecto al medio suplementado con casaminoácidos, extracto de levadura y polvo de remojo de maíz ($F= 141.16$; $gl= 4,25$; $P\leq 0.0001$) (**Figura 48**)

Al realizar las pruebas de germinación se observó la formación de micelio sobre la arcilla Attapulgita (GA) -325 con diferentes fuentes de nitrógeno (**Ver Figura 49**), hubo diferencia significativa en la viabilidad durante las primeras 48 horas cuando se cultivó en medio que contenía harina de soya ($F= 11.25$; $gl= 4,15$; $P\leq 0.0001$), posteriormente ya no se observaron diferencias estadísticas entre los medios hasta las 168 horas.

La harina de soya como fuente de nitrógeno fue el único medio que produjo conidios sobre la arcilla, por tal motivo se enfocaron los posteriores estudios en esta fuente de nitrógeno (**Figura 50D**). En la **Figura 51**, se observa la producción de peso seco de *Hirsutella citriformis* utilizando como fuente de nitrógeno Harina de Soya, se observó un peso seco inicial de 24.9 mg/mL, no existió diferencia significativa en la producción de micelio entre el cuarto y séptimo día de evaluación. ($F = 102.61$; $df = 3,68$; $P < 0.001$).

Se evaluaron diferentes soportes para observar la viabilidad (**Tabla 11**) y producción de conidios (**Figura 52**) de INIFAP-Hir-2 a partir de cultivo líquido crecido en medio de sales, vitaminas, glucosa 36 g/L y harina de soya como fuente de nitrógeno proporción de C:N de 10:1. Para ello se utilizaron 9 distintas arcillas (soportes inorgánicos) y tierra de diatomeas (soporte orgánico HYFLO). Respecto a la viabilidad a las 24 horas se observó que las arcillas AL2448, AL1630 y AT816 mostraron diferencia significativa frente a las restantes arcillas con un promedio de 78% de germinación ($F =15.71$; $df = 8, 27$; $P < 0.001$). A las 48 horas, cinco de las ocho arcillas evaluadas: AL1630, AT816, AL2448, MO2448, MO816, mostraron diferencia significativa con valores de 97, 91, 98, 97 y 89 % de germinación ($F = 36.88$; $df = 8, 27$; $P <$

0.001). A las 72 horas las arcillas mencionadas llegan al 100% de germinación mostrando diferencia significativa con la arcilla AT1630, HYFLO y VES140 las cuales cuentan con un 35, 74 y 63% de germinación respectivamente ($F = 28.38$; $df = 8, 27$; $P < 0.001$). A las 96 horas HYFLO cuenta con un 83% de germinación mostrando diferencia significativa entre la arcilla AT325 y VES140 ($F = 18,13$; $df = 8, 27$; $P < 0.001$). A las 120 horas la arcilla AT325 solo conto con un 61% de germinación y VES140 con un 85% de germinación ($F=16,92$; $df = 8, 27$; $P < 0.001$). Sin embargo al momento de evaluar la producción de conidios (**Figura 52**) Tierra de diatomeas (HYFLO), AL2448 y la arcilla AT1630 mostraron diferencia significativa respecto a las 5 arcillas restantes a los 12 días de evaluación. ($F = 6.54$; $df = 8, 17$; $P < 0.001$) con una producción de 1.78×10^7 , 1.53×10^7 , 1.42×10^7 respectivamente.

8. DISCUSIÓN

Es conocido el crecimiento lento del hongo *Hirsutella*, ya que depende de factores como tipo de cepa, naturaleza del substrato en el que se desarrolla y las proporciones de C/N presentes en el mismo (Quesada-Sojo et al. 2015). En nuestro estudio, realizado primeramente con las cepas silvestres, se observó un lento crecimiento en las ocho cepas evaluadas, que concuerda con lo reportado por Meyer et al. (2007) quien menciona que una característica distinguible de *Hirsutella citriformis* es su lento crecimiento, con una media de 5 cm de diámetro después de un mes en cultivo en papa dextrosa agar a 25°C, mientras que nosotros obtuvimos 4.98 cm de diámetro a los 32 días; la cepa INIFAP-Hir-2, IB-Hir-1 e IB-Hir-2 mostraron significativamente mayor crecimiento radial en medio PDA después de 50 días de incubación a 25°C (Ver Figura 18) mientras que las restantes cepas presentaron un menor crecimiento. Estudios realizados por Orduño-Cruz et al. (2015); Morales y Grillo (2002) y Pérez-Gonzalez et al. (2015) confirman que su crecimiento en condiciones de laboratorio es muy lento. Al adicionar extracto de levadura 0.5% al medio PDA, hubo una estimulación en el crecimiento, terminando su desarrollo en caja petri a los 35 días mostrando diferencia significativa las cepas: INIFAP-Hir-2, INIFAP-Hir-6 e INIFAP-Hir-7 respecto a las demás por lo que se comprueba lo que menciona Prakash (2007) y Pérez-González (2012) que el extracto de levadura es necesario para un mayor crecimiento micelial (Im et al. 1988). La producción de conidios es otro factor importante que debe ser tomado en cuenta para la selección del medio y de la cepa, es conocido que el conidio es la unidad infectiva y que la invasión al hospedante se produce inicialmente con la adherencia del conidio a la cutícula del insecto, por tal razón se evaluó la producción de conidios; ya que en varios reportes se menciona que el hongo produce bajas concentraciones de conidios in vitro (Boucias et al. 2007). Meyer et al. (2007), citado por Orduño-Cruz et al. (2015) menciona que *H. citriformis* produce un solo conidio por fiálide y que podría ser por este motivo, su baja concentración. Algunos investigadores como Orduño-Cruz et al. (2015) y Pérez-González et al. (2015) reportan en sus

estudios que *H. citrifomis* tuvo un lento crecimiento y esporulación usando como medio de cultivo agar dextrosa Sabouraud (SDA) con 3% extracto de levadura incubado en oscuridad a 25°C durante 40 días y PDAY 0.5% incubado a 25°C durante 34 días, respectivamente; mientras que en nuestro estudio se cultivó el hongo a una temperatura aproximada a 25±1°C, debido a que nos basamos en el reporte de (Boucias et al. 2007) de que la temperatura óptima para el crecimiento y conidiación está entre 25-30°C y se mantuvo con luz constante, ya que puede ser estimulante para el desarrollo de sinemas. La cepa INIFAP-Hir-2 mostró significativamente mayor cantidad de conidios, creció más densamente y produjo hifas aéreas con un valor de 4.95x 10⁵ conidios/ ml en caja petri. Hywel-Jones (1997) menciona en su estudio que se produjeron sinemas grises después de 4-6 semanas cuando el hongo había crecido hasta el borde de la placa, mientras que Subandiyah et al. (2000) menciona que alrededor de la quinta semana después de la inoculación de *Hirsutella citrifomis* se desarrollaron sinemas, característica que fue mostrada en el mismo tiempo por la cepa INIFAP-Hir-2, los mencionados estudios no muestran resultados de la producción de conidios. Sin embargo en el trabajo realizado por Pérez-Gonzalez et al. (2015) muestra que la más alta concentración (1.83x10⁷ conidios /ml) lo obtuvo de la cepa IB-Hir-2 lo cual difiere de nuestro resultado debido a que la cepa INIFAP-Hir-2 fue la que presentó diferencia significativa frente a las demás.

La germinación del conidio es otro parámetro importante ya que la velocidad de germinación es primordial para el desarrollo de la infección y muerte del insecto. La cepa INIFAP-Hir-2 presentó de 94 a 91% de germinación en medio PDA y PDAY mostrando diferencia significativa con la germinación en el agar agua a las 48 horas y esto difiere de Orduño-Cruz et al. (2015) donde obtuvo 30% de germinación después de 96 horas de incubación y atribuye el resultado al manejo de conidios en solución Tween 80 al 0.03% lo que probablemente removió su capa mucosa que cubre el conidio e influyó negativamente en la germinación. En los estudios de Hywel-Jones (1997), con

Hirsutella citriformis los conidios germinaron de 12-16 horas en medio PDA aunque debemos recordar que otros factores influyen en la germinación de un conidio: tipo de aislado, temperatura, humedad adecuada y en una menor proporción las condiciones de luz y nutricionales (Tanada y Kaya 1993). Una germinación rápida ayudará a tener mayor probabilidad de éxito en el campo. Los conidios requieren alrededor de 24 horas para germinar completamente y comenzar la colonización del sustrato, mientras que en la fermentación líquida (blastosporas/micelio) comienza inmediatamente; sin embargo las blastosporas presentan una vida corta y son más frágiles ante la desecación y por consideraciones económicas se tienen que producir conidios en sustratos de bajo costo (Boucias et al. 2007).

En el presente trabajo se evaluó el efecto de utilizar un cultivo bifásico y la relación que tiene cada sustrato con las cepas seleccionadas, se evaluaron tres sustratos económicos (avena, arroz y sorgo) que son comúnmente usados para la producción masiva de conidios de hongos entomopatógenos (Rosas-Acevedo et al. 1995; Sahayaraj et al. 2008; Prakash et al. 2008). Este método ha sido el más comúnmente usado en producción a gran escala para especies como *Beauveria spp.*, *Metarhizium anisopliae*, *Hirsutella thompsonii*, *Nomuraea rileyi* and *Verticillium leccani* (Derakhshan et al. 2008; Méndez et al. 2010).

Para la producción en cultivo bifásico, nosotros utilizamos como inóculo, un cultivo de *H. citriformis* de cada cepa crecida en medio de casaminoácidos (Jackson et al. 1997) durante 7 días en agitación continua a 250 rpm a 25°C. Los resultados obtenidos del método bifásico mostraron que la mejor producción fue en avena con una concentración de 9.33×10^6 conidios para la cepa IB-Hir-2, siguiéndole INIFAP-Hir-2 con 8.58×10^6 , no existiendo diferencia significativa entre los dos valores, sin embargo estos fueron bajos considerando que la evaluación duró alrededor de 48 días (Ver figura 24, 25 y 26).

Se usó otra técnica de cultivo para lograr obtener conidios en menor tiempo, donde se evaluaron los mismos sustratos (avena y arroz) con dos

variantes más: tipo de recipiente (vidrio y plástico) y el inóculo formado por una suspensión de conidios tomado directamente de una cepa esporulada de 6 semanas crecida en agar PDA. Los resultados obtenidos de este experimento mostraron que la avena promovió significativamente mayor producción de conidios que el arroz, y en cuanto al recipiente, fue mejor el de plástico que el vidrio, con una producción de 52.76×10^6 conidios/g a los 28 días (**Ver figura 27**) probablemente debido a que la avena guarda un alto contenido de humedad, y presenta 13.4% de proteína a diferencia del arroz que cuenta con 9% (Zabriskie et al. 2008). En relación a esto, investigaciones realizadas por Figueroa et al. (2007) mencionan que la avena presentó los mayores rendimientos en la esporulación del hongo entomopatógeno *P. fumosoroseous* ya que guarda un alto contenido de humedad. Los hongos utilizan ciertas proporciones de los nutrientes aportados por el sustrato durante su desarrollo y esporulación (Jenkins et al. 1998).

Por otra parte, Rosas-Acevedo et al. (1995) realizó estudios con cepas de *Hirsutella thompsonii* crecidas en diferentes sustratos inoculados con micelio obtenido en medio líquido, compuesto por harina de soya 50 g/l y dextrosa 10 g/l mantenidos en agitación constante a 100 rpm durante 4 días a 26°C encontrando los mejores resultados en arroz con valores arriba de 100×10^7 conidios/g en un tiempo de 20 días a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Aunque algunos autores mencionan el arroz como uno de los preferidos (Méndez et al. 2010; Jaronski and Jackson 2012), en nuestro estudio, el arroz presentó dificultades al utilizarse, ya que en su procesamiento algunas veces se aglutinaba debido a la capacidad que tiene para absorber el agua, lo cual no permitía la exposición al aire del hongo y esto afectaba la formación de los conidios. Esto concuerda con la evaluación de Posada-Flores et al. (2008) que evaluó la producción de *Beauveria bassiana* sobre arroz y reporta que es difícil de manejarlo y hacerlo escalar a producción industrial debido a su baja eficiencia. Por su parte Gandarilla-Pacheco et al. (2010) obtuvo valores de 2.35×10^8 esporas/g a los 14 días de incubación, y

comenta asimismo que *Beauveria bassiana* presentó dificultades al crecer sobre granos de arroz ya que permanecieron apelmazados posterior a su esterilización.

De los pocos reportes que hay en la literatura acerca de la producción de conidios y/o blastosporas de *Hirsutella*, aún no se ha desarrollado una metodología que produzca una mayor esporulación del hongo similar a otras especies de hongos entomopatógenos comúnmente usados como agentes de control biológico, como en el caso de *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae* o *Beauveria bassiana*,

Con el propósito de mejorar las características deseadas de producción de conidios y velocidad de crecimiento y germinación se realizó el proceso de mutagénesis con metanosulfonato de etilo (EMS), en donde la cepa INIFAP-Hir-2 fue la seleccionada en base a sus características de producción de conidios y tasa de crecimiento radial. El EMS reacciona directamente con el ADN produciendo mutaciones al azar que causan cambios permanentes en la secuencia de ADN, induciendo mutaciones puntuales donde la GC hace la transición a AT. (Ribeiro et al. 2013; Loewe 2008; Segal 1984).

Las bajas concentraciones de EMS produjeron una alta supervivencia de las colonias mutantes a diferencia de la concentración más elevada (10,000 µg/ml) durante un tiempo de exposición de tres horas, la cual redujo drásticamente la proporción de colonias mutantes lo cual concuerda con los autores Radha et al. (2012), Rakariyatham et al. (2006) Shivanna et al. (2009) que obtuvieron de 90 a 99,25% de supervivencia, con mejora de las características deseadas. Shivanna et al., (2009) logró reducir la esporulación de *A. niger* usando concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 mM y observó que entre mayor la concentración del agente mutagénico menor es el porcentaje de supervivencia. Asimismo, en otros estudios utilizando concentraciones de EMS que variaron de 2 a 10 mg se reportó el incremento de proteasas en mutantes de *Aspergillus niger* (Radha et al. 2012), mientras que Rakariyatham et al. (2006) agregó 300 µl de EMS a una suspensión de esporas de 10^9 /ml de *Aspergillus* sp, y obtuvo 1 % de esporas

sobrevivientes durante 150 minutos de incubación, lo que incrementó la producción de morisinasa

Se seleccionaron inicialmente 63 cepas mutantes, que fueron analizadas en base a su crecimiento radial y producción de conidios, las cuales mostraron incremento en crecimiento radial donde una de ellas (51-11) presentó 0.20 cm/día, mientras que la cepa silvestre mostró 0.16 cm/día en medio PDAY. Este valor fue mayor que los reportados por Meyer et al. (2007) para cepas de *H. citriformis* aisladas de liviidos de cítricos asiáticos micosados en Florida, que informaron una tasa de crecimiento diario de 0,083 cm en medio Sabouraud dextrosa agar con extracto de levadura al 1%, mientras que el crecimiento de otras cepas mexicanas de *H. citriformis* que probamos (Pérez-Gonzalez et al., 2015a) varió de 0.1117 (cepa INIFAP-Hir-6) a 0.0856 cm día⁻¹ (cepa INIFAP-Hir-1). Así, el aumento en varios mutantes fue de casi dos veces; aunque estas cepas mostraron aumento en el crecimiento radial, varias de ellas no produjeron sinemas, razón por la cual fueron descartadas. Posteriormente se sometieron a análisis de germinación y producción de conidios en PDAY y sustrato avena.

En los estudios de producción de conidios en agar PDA más extracto de levadura, se encontró un aumento significativo en la producción de conidios en la cepa mutante 53-10, con valor de 7.61×10^6 conidios /ml representando 4.56 veces más que la producción de la cepa silvestre, posterior a la seis semanas (3.05×10^6). Sin embargo, Pérez-González et al. (2015a) obtuvo valores de 1.48-18.33 $\times 10^6$ conidios ml⁻¹ en las condiciones de cultivo que usó; mientras que Orduño-Cruz et al. (2015) encontró de 0.8- 70 $\times 10^6$ conidios /cm² para las cepas que usó en medio de agar (SDAY) a 25°C. Otros factores abióticos que pueden afectar la producción de conidios son la luz, la humedad y la temperatura (Orduño-Cruz et al. 2011).

En la evaluación de producción de conidios sobre avena, a los 14 días se observó diferencia significativa en la producción de conidios entre la cepa mutante 53-10 que presentó 1.95×10^6 conidios/g respecto a la cepa silvestre (1.36

$\times 10^6$ conidios/g) siendo la cepa mutante 101-11 la de más baja producción (7.20×10^5). En resultados presentados por Pérez-González et al. (2015) reporta una producción de 1.94×10^7 conidios /g sobre el sustrato arroz para la cepa INIFAP-Hir-2 a los 14 días de incubación, en su estudio manifiesta un decremento en la producción de conidios a los 21 días, sin embargo en nuestro estudio, a los 21 días la cepa mutante 53-10 mostro nuevamente diferencia significativa (3.34×10^6 conidios/g) frente a la cepa silvestre (3.04×10^6 conidios/g) y solo hasta los 28 días comienza a descender la producción. En investigaciones realizadas por Reyes-Martínez et al. (2010) acerca de *Hirsutella citriformis*, reporta una esporulación de 5.9×10^7 conidios/g sobre hojuelas de avena a las tres semanas de inoculación obteniendo mejor producción comparado con trigo y arroz

Al realizar la técnica de microcultivo se observó que los sinemas de los mutantes lucieron más gruesos que la cepa silvestre mientras que el diámetro de los conidios en las cepas mutantes 101-11, 53-10, 51-6 mostró un tamaño significativamente mayor que la reportada en literatura (Boucias et al. 2007) para la cepa silvestre (2 a 4 μm) con valores de 6.45 a 6.99 μm . Con respecto a las tasas de germinación, la mutante 53-10 presentó una tasa más alta que las otras cepas mutantes, mostrando 80% germinación después de 24 h de incubación a 25°C, parcialmente similar a la cepa silvestre. Sin embargo, reportes similares acerca de esta característica han sido publicados, (Orduño-Cruz et al. 2015) donde la tasa de germinación fue de solamente 30% después de 96 horas y hasta 60% de germinación después de 168 horas de incubación a temperaturas de 20-30°C. Concerniente a estos temas, se han identificado características conidiales específicas, que se consideran buenos indicadores de virulencia, incluyendo el tamaño de esporas, la alta velocidad de esporulación, de adhesión y de germinación (Altre et al. 1999, Chandler et al. 1993, Lane et al. 1991).

Para los bioensayos se eligió la cepa mutante 53-10 ya que mostró características mejoradas en cuanto a producción de conidios. En los resultados

obtenidos en el bioensayo, muestran que la mortalidad del liviido *Diaphorina citri* inició al tercer día de haber estado en contacto con conidios de la cepa INIFAP-Hir-2, así como de la cepa mutante seleccionada 53-10; esto se puede comparar con los resultados obtenidos por Pérez-Gonzalez et al. (2015) donde reporta que la mortalidad inició a los 6 días, para la misma cepa silvestre, mientras que al igual que nuestro estudio, Casique-Valdés et al. (2011) reporta el mismo tiempo de inicio de mortalidad de insectos inoculados con conidios producidos en agar. El tiempo para mortalidad que reporta Pérez-González et al. (2015) es de 6 a 27 días, lo cual difiere del nuestro, ya que a los 12 días encontramos 95 y 100% de mortalidad para las cepas silvestre y mutante 53-10 respectivamente; no encontrando diferencia significativa entre ellas.

Por su parte, Reyes-Martínez et al. (2010) observó 72% de mortalidad de *Diaphorina citri* en el noveno día posterior a la inoculación por *Hirsutella citriformis* producido por cultivos en laboratorio, la mortalidad obtenida fue cercana con nuestro resultado, ya que al noveno día en nuestro estudio se obtuvo 84% de mortalidad para la cepa silvestre y 98% para la cepa mutante 53-10, no mostrando diferencia significativa; mientras que Meyer et al. (2007) reportó mortalidad del 100% de 9-10 días posteriores a la inoculación con conidios cosechados en arroz.

En nuestro estudio se observó un micosamiento de 60% a los 12 días de inoculación de la cepa silvestre, comparado con 69% de la cepa mutante 53-10 existiendo diferencia significativa entre ellas. En el estudio de Casique-Valdés et al. (2011) se encontró que los sinemas emergieron de los cadáveres de los insectos posterior a 10 días, en nuestro estudio sin embargo, a los 9 días se comenzaron a ver las estructuras típicas de *Hirsutella citriformis* sobre los insectos muertos donde los sinemas de la cepa mutante lucían más gruesos a diferencia de los sinemas de la cepa silvestre que mostraron un aspecto delgado.

Además de estos estudios, la cepa INIFAP-Hir-2 fue cultivada en varios medios de cultivo líquido donde el objetivo fue encontrar las condiciones óptimas para el

máximo rendimiento de micelio y posterior esporulación. Se observaron concentraciones bajas de biomasa en los medios suplementados con glucosa a una concentración de 8g/L con respecto a los medios donde la concentración fue de 36 g/L, siendo la relación 10:1 de C:N, con la que se obtuvo mejor rendimiento de biomasa (19.47 g/L), respecto a los demás. Resultados similares se obtuvieron en el estudio de Fargues et al. (2002), con cepas del género *Metarhizium*, quien obtuvo elevadas cantidades de propágulos en sustratos líquidos, destacándose aquellos resultados donde la concentración de carbono fue de 36 g/L y una relación C:N de 10:1. Por su parte, en estudios de Vega et al. (2002) evaluaron diferentes concentraciones de carbono y la relación C:N, y encontraron mejores rendimientos de *P. fumosoroseus* al día séptimo de evaluación cuando era cultivado en un ambiente nutricional más rico (elevada concentración de carbono, más baja relación C:N). Podemos decir que la relación C:N juega un papel importante ya que de este equilibrio depende que se obtenga un mejor rendimiento de propágulos. Varios investigadores han examinado como los nutrientes en los medios basales afectan el crecimiento del hongo y su esporulación, buscando determinar los componentes y concentraciones óptimos para la producción de biomasa (Liu y Chen 2002). Cabe resaltar que en ningún medio líquido probado, hubo producción de conidios.

La germinación es otro factor determinante de la patogenicidad que se ve afectado por las condiciones nutricionales. Varios sustratos orgánicos se han propuesto para esporulación de hongos, como trigo, arroz, avena, bagazo de trigo, etc, sin embargo en los últimos años se han identificado varios sustratos inorgánicos como arcillas que son minerales económicos que han sido utilizados ampliamente en muchas formulaciones (Desgranges et al 1993; Guillon 1997) ya que en sus poros abiertos el hongo esporula en el interior de las cavidades, adicional a esto, las arcillas contienen grandes cantidades de minerales traza. El uso de gránulos de arcilla para producir esporulación en *Hirsutella citriformis* aún no ha sido descrito, la arcilla aluminosilicato hidratado se compone fundamentalmente de aluminio y sílice, altamente absorbente, que mostró un

80% de germinación al tercer día de evaluación en contraste con la arcilla Montmorillonita que pertenece al grupo de los silicatos, que mostró un 54% de germinación bajo las mismas condiciones. La arcilla Montmorillonita, se compone por una capa central que contiene aluminio y magnesio. Con respecto a esto, Shipton (2014) menciona en su libro que algunas estructuras fúngicas pueden absorber ciertos minerales arcillosos que resultan en una reducción en la disponibilidad de hierro y en la interferencia con el movimiento transmembrana de nutrientes, metabolitos y gases, y podría servir para explicar porque la cepa INIFAP-Hir-2 reduce su respiración en presencia de la arcilla montmorillonita y se obtuvieron mejores resultados con la arcilla aluminosilicato hidratado.

Se procedió a evaluar el peso seco (micelio) producido usando diferentes fuentes de nitrógeno baratas, ya conociendo la relación C:N mejor. Es conocido que el nitrógeno es uno de los componentes más caros del medio de fermentación (Kobori et al. 2014), se utilizaron subproductos agrícolas económicos y ricos en contenido de nitrógeno. Los resultados mostraron que la caseína hidrolizada, extracto de levadura y polvo de remojo de maíz produjeron los valores más bajos con un promedio de 20 mg/mL, mientras que la harina de algodón y harina de soya mostraron los valores más elevados con un promedio de 50 mg/mL, por lo que se observa que la naturaleza de la fuente de nitrógeno afecta predominantemente en el propágulo obtenido. Los hongos en su gran mayoría prefieren el consumo de fuentes de nitrógeno orgánico que contienen mezcla de aminoácidos que permiten un rápido crecimiento del microorganismo (Griffin 1981). Asimismo, algunas especies son capaces de asimilar sales de amonio, sulfato de amonio, siendo el más económico y el más comúnmente usado, sin embargo, en nuestro estudio, la cepa INIFAP-Hir-2 no mostró crecimiento utilizando sulfato de amonio. Respecto al medio a base de polvo de remojo de maíz Winkelhoff y McCoy (1984) obtuvieron 15.8 mg/mL de biomasa, utilizando un medio de cultivo a base de líquido de remojo de maíz (10 g/l), en nuestro experimento se utilizó 5 g/L obteniendo una concentración de micelio de 21.41 mg/mL. McCoy et al. (1972) obtuvo 22,43 mg/mL de biomasa, utilizando

medios que contenían dextrosa o sacarosa, además de extracto de levadura o peptona. Mientras tanto, Li et al. (2010) obtuvo un promedio de biomasa de 10.06 g/L en medio con 2.5% de sacarosa y 0.5% de peptona. En estudios más recientes con *Hirsutella citriformis* (Romero-Rangel et al. 2012) obtuvo un rendimiento de biomasa de 76.3 ± 5.9 mg/mL en medio casaminoácidos después de 14 días de incubación, mientras que en nuestro estudio se obtuvo un rendimiento de 19 g/L posterior a los 7 días de incubación.

Se procedió a evaluar la viabilidad del cultivo en la arcilla Attapulgita que suele llevar impurezas hierro y potasio. A partir de las 24 horas el medio conteniendo harina de soya mostró mayor viabilidad con diferencia significativa respecto a los demás medios, siendo este el único medio que mostro desarrollo de sinemas a los 12 días de incubación a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con luz constante, por lo que nuestra investigación se enfocó en este medio. Se realizó una segunda repetición para evaluar el peso seco del medio harina de soya como fuente de nitrógeno, la máxima producción fue de 37 mg/mL, no encontrando diferencia significativa entre el cuarto y séptimo día.

Se evaluó posteriormente la viabilidad en 9 diferentes arcillas ya que durante el estudio se observó que el tipo de arcilla influye en la germinación y esporulación del hongo. A las 24 horas se observaron diferencias significativas, el resultado sugiere que el tipo de arcilla influyó en el crecimiento y actividad del hongo.

La sobrevivencia de la cepa después de ser secada por aire (<5% humedad) en tierra de diatomeas (Hyflo) mostró una viabilidad de 94% a los 6 días de evaluación y una producción de 1.78×10^7 conidios g^{-1} a los 12 días de su inoculación siendo la concentración más elevada obtenida en nuestro estudio, Jaronski (2014) menciona que tiene una alta relación superficie/volumen y puede absorber líquidos acuosos hasta 110 -140% de su peso. La producción más baja fue en la arcilla VES140 con 2.16×10^6 conidios g^{-1} . Respecto a los resultados se confirma que parámetros como el contenido de humedad, permeabilidad,

porosidad, densidad, forma y tamaño de las partículas en las arcillas influyen en los rendimientos obtenidos. En esta investigación se obtuvo un medio de cultivo líquido óptimo para producir propágulos de la cepa INIFAP-Hir-2 y se probaron diferentes sustratos inorgánicos que pueden ser factibles para obtener una mejor producción de conidios, adicional a esto las arcillas incrementan la vida de anaquel de los conidios.

Los resultados mostrados son importantes, ya que el hongo es de lento crecimiento y si se puede lograr rendimientos altos de biomasa en corto tiempo, posteriormente se podrán inocular sustratos sólidos para obtener buena esporulación también en corto tiempo.

9. CONCLUSIONES

- 1.- Las cepas silvestres INIFAP-Hir-2, IB-Hir-1 e INIFAP-Hir-5 presentaron significativamente la mayor tasa de crecimiento radial, mostrando valores de 3.63, 3.67 y 3.60 cm respectivamente, a los 50 días en medio PDA.
- 2.- La tasa de crecimiento radial varió de 0.057 cm /día (IB-Hir-2) a 0.073 cm /día (INIFAP-Hir-2) en medio PDA.
- 3.- Cuando las cepas fúngicas se cultivaron en medio PDA con 0.5% de extracto de levadura, el crecimiento radial varió de 0.084 (INIFAP-Hir-4) a 0.1cm/día (INIFAP-Hir-2, INIFAP-Hir-6), por lo tanto el crecimiento radial fue estimulado por el extracto de levadura.
- 4.-La cepa INIFAP-Hir-2 presentó la mayor producción de conidios en agar PDA y difirió significativamente del resto de las cepas.
- 5.- La cepa INIFAP-Hir-2 a las 48 horas alcanzó 95% de germinación en el medio PDA y se identificó como mononucleada.
- 6.- En la producción de cultivo bifásico, la mayor concentración de conidios se obtuvo con la cepa IB-Hir-2 sobre avena con 9.33×10^6 conidios/g siguiéndole INIFAP-Hir-2 con 8.58×10^6 conidios/g.
- 7.- La cepa INIFAP-Hir-2 fue la seleccionada para la mutación en base a sus características de producción de conidios y tasa de crecimiento radial.
- 8.-La cepa INIFAP-Hir 2 mostró mayor producción de conidios en avena que en arroz, y el recipiente plástico fue mejor que el de vidrio, obteniéndose una producción de 52.76×10^6 conidios/g a los 28 días.
- 9.-Se probaron distintas dosis del agente mutágeno EMS, desde 50 hasta 10,000 $\mu\text{g/ml}$, así como tiempos de contacto, desde 30 hasta 180 minutos.

9.-Despues de la mutágenesis se obtuvieron 63 colonias mutantes, las cuales fueron caracterizadas en base a crecimiento radial, producción de conidios y germinación.

10.- Las mutantes obtenidas mostraron fenotipos diversos así como variaciones en las características morfológicas, donde se descartaron inicialmente aquellas que no mostraron formación de sinemas y conidios.

11.-En los experimentos de producción de conidios y velocidad de germinación sobresalieron 4 cepas (101-11, 53-10, 51-6 y 103-9), las cuales fueron comparadas con la cepa silvestre.

12.-De las 4 cepas mutantes, la 53-10 mostró mejor producción de conidios que la cepa silvestre tanto en agar PDA como en el sustrato avena, con una producción de 3.34×10^6 conidios/g a los 21 días de incubación a 25°C.

13.- En velocidad de germinación, a las 24 horas se observó que la cepa mutante 53-10 mostró diferencia significativa respecto a las restantes cepas mutadas y diferencia parcial respecto a la cepa silvestre.

14.- Cuando se realizaron microcultivos, se encontró diferencia significativa en el diámetro de los conidios formados por las cepas mutantes 101-11, 53-10 y 51-6 respecto a la cepa silvestre y la cepa mutante 103-9.

15.- En el bioensayo contra *D. citri*, realizado con la cepa silvestre y mutante, al noveno día mostraron 84% y 98% de mortalidad respectivamente.

16.- La cepa mutante 53-10 mostró mejoramiento en producción de conidios, comparada con la cepa silvestre sin afectar la patogenicidad sobre el insecto blanco.

17.- En la producción de biomasa de la cepa INIFAP-Hir 2 en cultivo líquido, al séptimo día de la inoculación en el medio suplementado con glucosa a una

concentración de 36 g/L y casaminoácidos con una relación C:N de 10:1 mostró los mejores rendimientos de biomasa con una producción de 19.47 g/L.

18.- El mayor peso seco se obtuvo cuando se utilizó como fuente de nitrógeno la harina de semilla de algodón (51.30 g/L) y harina de soya (48.40 g/L), los cuales mostraron diferencia significativa respecto a los medios suplementados con casaminoácidos, extracto de levadura y polvo de remojo de maíz.

19.- La harina de soya fue la única fuente de Nitrogeno, en donde se desarrollaron sinemas.

20.- Se evaluaron 9 distintos soportes para observar viabilidad y formación de conidios, donde las arcillas de aluminosilicato y montmorillonita resultaron más adecuados para conservar la viabilidad.

21. El soporte orgánico tierra de Diatomeas (HYFLO), mostró una mejor producción de conidios, después de la inoculación con cultivo líquido, a los 12 días de evaluación.

22.- La sobrevivencia de la cepa después de ser secada por aire (<5% humedad) en tierra de diatomeas (Hyflo) mostró una viabilidad de 94% a los 6 días de evaluación y una producción de 1.78×10^7 conidios g/ a los 12 días de su inoculación siendo la concentración más elevada obtenida en nuestro estudio.

23. Los resultados mostrados son importantes, ya que el hongo es de lento crecimiento y si se puede lograr rendimientos altos de biomasa en corto tiempo, posteriormente se podrán inocular sustratos sólidos para obtener buena esporulación también en corto tiempo.

10. PERSPECTIVAS

Es importante realizar pruebas de inocuidad a insectos no blancos para determinar los efectos de la cepa mutante sobre los insectos benéficos que pudiera tener potencial para el control del liivido.

Evaluar la mortalidad sobre ninfas de *Diaphorina citri*, se recomienda realizar un bioensayo utilizando la cepa mutante 53-10 de *Hirsutella citriformis*

Realizar otras técnicas de bioensayos así como conocer la concentración letal media de conidios de la cepa mutante a utilizar para evitar variabilidad.

Evaluar una amplia combinación de medios utilizando sustratos baratos y con nutrientes para así optimizar las condiciones nutricionales para obtener una mayor producción de biomasa.

Evaluar la viabilidad de la cepa en los formulados con arcillas en distintos tiempos de almacenamiento y temperaturas para que puedan ser usadas de manera más efectiva en el manejo integrado de plagas.

Realizar bioensayos de laboratorio y campo con los formulados con arcillas para saber si son efectivos contra los insectos blanco

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed M, Bondkly EL, Abeer AK. 2007. UV-and-EMS-induced mutations affecting synthesis of alkaloids and lipase in *Penicillium roqueforti*. Arab Journal of Biotechnology, Vol. 10, No (2): 241-248.
- Altre JA, Vandenberg JD & Cantone FA. 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. Journal of Invertebrate Pathology 73: 332–338.
- Aubert B. 1987. *Trioza erytreae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. Fruits, 42(3):149-162, 189-192.
- Aubert B, Grisoni M, Villemin M, Rossolin G. 1996. A case study of Huanglongbing (greening) control in Reunion. In: “Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists” (eds. da Graça JV, Moreno P, Yokomi RK), IOCV, Riverside 276 - 278.
- Aurambout JP, Finlay KJ, Luck J, Beattie GAC. 2009. A concept model to estimate the potential distribution of the Asiatic citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama) in Australia under climate change- A means.
- Albrecht U, Bowman KD. 2008. Gene expression in citrus sinensis (L.) osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. Plant Science, 175(3), 291e306.
[http:// dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.05.001](http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.05.001).
- Arzumanov T, Jenkins N, Roussos S. 2005. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Process Biochemistry 40 1037–1042.

- Álvarez FJ, Montes de Oca NF, y Grillo RH. 1994. Hongos entomopatógenos de *Diaphorina citri* Kirk. (Homoptera; Psyllidae) en Jovellanos, Matanzas. 12.
- Auld BA. 1992. Mass production, formulation and application of fungi as biocontrol agents pp: 219-229. In: Lomer, C, J. & C. Prior (eds). Biological control of locusts and grasshoppers. Wallingford, Inglaterra. Centre for Agricultural Bioscience International. 394
- Barajas GC, Del Pozo EM, Garcia I y Mendez A. 2010. Obtención de conidios del aislamiento ma-002 de *Metarhizium anisopliae* (metsch.) sorokin mediante una alternativa de cultivo bifásico. Revista de Protección Vegetal. Vol. 25 No. 3 174-180.
- Bassanezi RB. 2014. Entrevista al Dr. Renato B. Fundecitrus. Sao Paulo presume de su éxito en la lucha contra el HLB. Portal frutícola
- Bateman R. 2007. Production Processes for Anamorphic Fungi. IPARC, Silwood Park, Ascot, Berks. http://www.dropdata.net/mycoharvester/Mass_production.PDF (accessed 24.11.12.).
- Budak-Diler S and Topaktas M. 2010. Journal of Cell and Molecular Biology; 7(2) & 8(1): 25 – 34
- Burckhardt D, Ouvrard D. 2012. A revised classification of the jumping plant-lice (Hemiptera:Psylloidea). Zootaxa 3509:1-34.
- Boucias DG, Meyer JM, Popoonsak S, Breaux E. 2007. The genus *Hirsutella*: A polyphyletic group of fungal pathogens infecting mites and insects. In: Ekesi S, Maniania NK, Editors. *Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management*. 1–34. Old City Publishing.

- Bove JM. 2006. Huanglongbing: a destructive, newlyemerging, century old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88:7-37.
- Bove JM, Teixeira DC, Wulff NA, Eveillard S, Saillard C. 2008. Several Liberibacter and phytoplasma species are individually associated with HLB. *International Research Conference on Huanglongbing*, 152–55.
- Cabrera RI. 2001. *Hirsutella thompsonii* Fisher y los plaguicidas químicos en una nueva estrategia para el manejo integrado del ácaro del moho *Phyllocoptruta oleivora* Asmead (Acarina: Eriophyidae) en cítricos». Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Investigaciones de Cítricos y Otros Frutales.
- Cabrera RI, González C, Hernández D, Rodríguez JL. 2004. Presencia del hongo *Hirsutella citriformis* sobre *Diaphorina citri* Kuw. (Homoptera: Psyllidae) en los cítricos de Cuba. *Levante Agrícola* 43(369).
- Casique-Valdes R, Reyes-Martinez AY, Sanchez-Pena SR, Bidochka MJ, Lopez-Arroyo JI. 2011. Pathogenicity of *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Cordycipitaceae) to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Florida Entomologist*. 94 (3), 703–705.
- Casique-Valdés R, Sánchez-Peña SR. 2010. Entomopathogenic fungi attacking the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in the Gulf citrus zone of Mexico, pp. 2-3 In Proc. 58th Ann. Mtg. Southwestern Branch of the Entomological Society of America, Cancun, Mexico. 60.
- Carballo M. 1998. Formulación de hongos entomopatógenos. *Revista Manejo Integrado de Plagas* 47:1-4.

- Chandler D, Heale JB & Gillespie AT. 1993. Germination of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* on scales of the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *Biocontrol Science and Technology* 3: 161–164.
- Cherry A, Jenkins N, Heviefo G, Bateman R, Lomer C. 1999. A West African pilot scale production plant for aerial conidia of *Metharizium sp*, for use as a mycoinsecticide against locusts and grasshoppers. . *Biocontrol Science and Technology*. 9, 35-51.
- Clarkson JM, Charnley AK.1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology* .4:197-204.
- Copping LG (Ed.), 2001. *The Biopesticide Manual*, 2nd edn. British Crop Protection Council, Farnham
- Coronado BJ, Ruíz CE. 2004. Registro del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) para México. *Folia Entomologica Mexicana* 43(1):165-166.
- Coulondre C and Miller JH. 1977. Genetic studies of the lac repressor. IV. Mutagenic specificity in lacI gene of *Escherichica coli* *Journal of Molecular Biology*. 117:577-606
- Da Graca JV, Korsten L. 2004. Citrus Huanglongbing: review, present status and future strategies, *In: Naqvi, S. A. M. H. (Ed.)*. Diseases of fruits and vegetables. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 1: 229-245.

- Desgranges C, Vergoignan C, Lereec A, Riba G, Durand A. 1993. Use of solid state fermentation to produce *Beauveria Bassiana* for the biological control of European corn borer *Biotechnology Advances* 11, 577-587
- 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. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 11(11):1506 - 1509.
- Dhingra OD, Sinclair JB. 1995. *Basic Plant Pathology Methods*. CRS Press, Inc. Boca Raton, Florida, 335.
- Dwiastuti, M.E. y M. Y. Kurniawati. 2007. The efectivity of entomopathogen of *Hirsutella citriformis* (Deuteromycetes: Moniliales) on Psyllid *Diaphorina citri* Kuw. Indonesian Centerfor Horticulture Research and Development. Indonesia. 1 p
- 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
- 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, 331–333.
- Fargues J, Smits N, Vidal C, Vey A, Vega F, Mercadier G. 2002. Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologia*. 154(3):27-138.

- Fang W, Pava-Ripoll M, Wang S, St Leger R. 2009. Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genetics and Biology* 46:277–285.
- Feng K, Liu B & Tzeng Y. 2000. *Bioprocess Engineering* 23: 25.
- Feng MT, Poprawski G, Khachatourians G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*. 4:3-34.
- Fernández M, Miranda I. 2005. Comportamiento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae) Parte I: características morfológicas, incidencia y enemigos naturales asociados. *Revista de Protección Vegetal* 20 (1): 27-31
- Figuroa LM, Varela A, Corredor D. 2007. Evaluación de sustratos naturales para la propagación masiva del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumoroseous* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) *Revista de Investigación* año/ vol. 7, numero 001 Universidad La Salle Bogotá Colombia. 127 – 131.
- Fujimura H. 1998. Identification of the *mgc1* mutation which affects mating-pheromone-induced morphogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 161: 359-364
- Gandarilla-Pacheco FL, Lopez-Arroyo JI, Galan-Wong LJ, Quintero-Zapata I. 2013. Pathogenicity of native entomopathogenic fungi from the Mexican citrusgrowing area against *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *Southwestern Entomologist*. 38, 325–338.

- Gandarilla-Pacheco FL, Galán-Wong LJ, Arévalo-Niño K, Elías-Santos M & Quintero-Zapata I. 2013. Evaluación de aislados nativos mexicanos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) provenientes de zonas citrícolas para su producción masiva en cultivo sumergido y bifásico. *Agrociencia*, 47(3), 255-266.
- García DC. 2009. Distribución del huanglongbing (HLB-greening en el mundo). México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación y Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria Argentina. 13 p2.
- González CJC, Castellanos SIE, Fucikovsky ZJ, López HM, Sánchez RG, Elorza MP. 2008. Dinámica de población y tasa de infección de *Diaphorina citri* al hongo *Hirsutella citriformis* en *Citrus sinensis* en Tuxpan, Veracruz, México.
- Gottwald TR, da Graca JV, Bassanezi RB. 2007. Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2007-0906-01-RV.
- Guillon M. 1997. Production of biopesticides: scale up and quality assurance. Microbial insecticides novelty or necessity? Proc. 1997 British Crop Protection Council Symp. No. 68, pp151-162.
- Griffin D. 1981. Fungal physiology. A while-intercience publication, USA. New York. Pp 102-127 260-279
- Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC y Carroll SB. 2008. Genética. 9ª. Edición. McGraw-Hill. Interamericana. Madrid.
- Halbert SE. 1998. Entomology section. Triology Technical Report 37: 6–7.

- Halbert SEK, Manjunath L, 2004. Asian citrus psyllid (Stenorrhynca: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. Florida Entomologist 87(3): 330–353.
- Halbert SE. 2005. Pest Alert: Citrus Greening/Huanglongbing. Disponible en: www.imok.ufl.edu/hlb/database/pdf/00002388.pdf
- Halbert SE, Nunez CA. 2004. Distribution of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Stenorrhyncha: Psyllidae) in the Caribbean basin. Florida Entomologist 87:401-402.
- Hall DG, Albrigo LG. 2007. Estimating the relative abundance of flush shoots in citrus, with implications on monitoring insects associated with flush. HortScience. 42: 364-368.
- Hall DG, Hentz MG, Adair RC. 2008. Population ecology and phenology of *Diaphorina citri* in two Florida citrus groves. Environmental Entomology 37:914–924.
- Hall DG, Hentz MG, Meyer JM, Kriss AB, Gottwald TR., Boucias DG. 2012. Observations on the entomopathogenic fungus *Hirsutella citriformis* attacking adult *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in a managed citrus grove. BioControl 57, 663–675.
- Hywel-Jones NL. 1997. *Hirsutella* species associated with hoppers (Homoptera) in Thailand. Mycological Research 101: 1202-1206
- Humber RA. 2007. Recent phylogenetically bases reclassifications of fungal pathogens of invertebrates (ARSEF). Insect Mycologist and Curator.

- Hsiao YM, Ko JL. 2000. Determination of destruxins, cyclic peptide toxins, produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate and ultraviolet using HPLC method. *Toxicon* 39 (2001) 837±841
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1974. “Some Anti-thyroid and Related Substances, Nitrofurans and Industrial Chemicals”. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 7. Lyon France: International Agency for Research on Cancer pp. 326.
- Inoue H, Ohnishi J, Ito T, Tomimura K, Miyata S, Iwanami T. 2009. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. *Annals of Applied Biology* 155:29–36.
- Irum W and Anjum T, 2012. Production enhancement of Cyclosporin ‘A’ by *Aspergillus terreus* through mutation. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(7), pp. 1736-1743, 24.
- Jagoueix S, Boys JM, Garnier M. 1994. The phloemlimited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the *Proteobacteria*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44: 379-386.
- Jackson M. 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. Alemania. 19: 180-187.
- Jackson MA, Cliquet S, Iten LB. 2003. Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal

fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Science and Technology*. 13, 23–33.

Jackson MA. & Slininger PJ. 1993. Submerged culture conidial germination and conidiation of the bioherbicide *Colletotrichum truncatum* are influenced by the amino acid composition of the medium. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 417–422.

Jagoueix S, Bove JM, Garnier M. 1996. PCR detection of the ‘*Candidatus*’ *Liberibacter* species associated with greening disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes* 10: 43–50.

Jaronski ST. 1986. Commercial development of deuteromycetous fungi of arthropods: a critical appraisal. In *Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology* (ed. R. A. Samson, J. M. Vlak & R. Peters), Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, Wageningen, Netherlands, pp. 653–656.

Jaronski ST. Jackson MA. 2012. Mass production of entomopathogenic hypocreales. In: Lacey, L.A. (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, second ed. Academic Press, New York, NY, pp. 255–284.

Jenkins NE, Prior C. 1993. Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviridae* in a simple liquid medium. *Mycological Research*. 97, 1489-1494.

Jenkins NE, Heviefó G, Langewald J, Cherry AJ, Lomer CJ. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information*. 19 (1), 21N-31N

Jimenez SA, Guerrero R. 1983. *Genética Molecular Bacteriana*. Editorial Reverte.

- Kava-Cordeiro V, Luna EA, Azevedo JL. 1995. Survival y Mutant Production Induced by Mutagenic agents in *Metarhizium anisopliae*. Scientia Agricola (Piracicaba, Braz) 52(3): 548-554.
- Khangura JS, Singh H. 1984. Effect of sprayers on the effectiveness and persistence of LVC and EC formulations of dimethoate against *Diaphorina citri* Kuwayama on citrus. Journal of the Entomological Research Society. 8:31 –35.
- Kobori NN, Mascarin GM, Jackson MA, Schisler DA. 2014. Liquid Culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease by *Rhizoctonia solani*
- Lane BS, Trinci APJ & Gillespie AT. 1991. Influence of cultural conditions on virulence of conidia and blastospores of *B. bassiana* to the green leaf hopper. Mycological Research 95: 829–833.
- Laszlo P. 1990. Mundo Científico, 102, 552.
- Latgé JP, Hall RA, Cabrera RI & Kerwin JC. 1986. Liquid fermentation of entomopathogenic fungi. In Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology (ed. R. A. Samson, J. M. Vlák & D. Peters), Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, Wageningen, Netherlands.
- Leonard CA, Brown SD, Hayman RJ. 2013. Random Mutagenesis of the *Aspergillus oryzae* Genome Results in Fungal Antibacterial Activity. International Journal of Microbiology.
- Loewe L. 2008. Genetic Mutation. Nature Education 1(1):113

- Li Z, Alves SB, Donald RW, Fan M, Delalibera Jr. Italo, Tang J, Lopes RB, Faria M, Rangel DEN.2010. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi, *Biocontrol Science Technology*. 20 (2): 117-136.
- Liu XZ, Chen SY .2002. Nutritional requirement of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis*. *Biocontrol Science Technology*. 12:381-393.
- 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, Editors. *Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing. Dec. 1-5, 2008. Orlando, Florida*. Plant Management Network.
- López-Arroyo JI, Peña MA, Rocha-Peña MA, Loera J. 2004. Occurrence of the asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in México. Proceedings of the XVI Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Monterrey, N.L. México, November.
- López-Arroyo, J. I., M. A. Peña, M. A. Rocha-Peña y J. Loera. 2005. Ocurrencia en México del psílido asiático *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae). In : Memorias del VII Congreso Internacional de Fitopatología. Chihuahua, Chih., México. Pp. C68.
- López-Collado J. 2011. Distribución potencial de limonaria en México. In: *XXIV Reunión científicotechnológica forestal y agropecuaria Veracruz*. Xalapa, Veracruz.
- López-Collado J, López-Arroyo JI, Robles-García PL, Marquez-Santos M. 2013. Geographic distribution of habitat, development, and population growth rates of

- the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in Mexico. *Journal of Insect Science*. 13: 1-17.
- McCoy CW, Hill AJ, Kanavel RF. 1972. A liquid medium for the large scale production of *Hirsutella thompsonii* in submerged culture. *Journal of Invertebrate Pathology*. 19:370-374.
- McCoY CW. 1981. Pest control by the fungus *Hirsutella thompsonii*. In *Microbial Control of Pests and Plant Disease*. Ed. H. D. Burgess, p. 499-512. New York: Academic Press.
- Manjunath KL, Halbert SE, Ramadugu C, Webb S, Lee RF. 2008. Detection of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus Huanglongbing in Florida. *Phytopathology* 98(4): 387–396.
- Méndez A, del Pozo E, García I. 2010. Producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson mediante una alternativa de cultivo bifásico. *Revista de Protección Vegetal*. 24(3):156-161.
- Merk. 1989. *The Merck index*. 11th ed. Rahway, NJ: Merck and Company, Inc. 344-347.
- Meyer JM, Hoy MA, Boucias DG. 2007. Morphological and molecular characterization of a *Hirsutella* species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. *Journal Invertebrate Pathology* 95: 101–109.

- Michaud JP. 2001. Numerical response of *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae) to infestations of Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) in Florida. *Florida Entomologist*. 84: 608-612.
- Michaud JP. 2002. Biological control of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Florida: a preliminary report. *Entomological News*. 113 (3): 2169-223.
- Michaud JP. 2004. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. *Biological Control* 29: 260-269.
- Moore D, Higgins PM. 1997. Viability of Stored Conidia of *Metarhizium flavoviride* Gams y Rozsypal, Produced Under Differing Culture Regimes and Stored with Clays», *Biocontrol Science and Technology* 7:335-343, Inglaterra, 1997.
- OIRSA. 4 de Julio de 2009. Cuarta Edición. Plan de Regional de Contingencia para la Prevención y Contención del HLB en la Región de OIRSA
- Olivares- Saénz, E., 1994. Paquete de diseños experimentales. FAUNL. Versión 2.5. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N.L.
- Orduño-Cruz N, Guzmán-Franco AW, Rodríguez-Leyva E, Lopez-Collado J, Valdez Carrasco JM, Mora-Aguilera G. 2011. Susceptibility of the cactus weevil *Metamasius spinolae* to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* under laboratory and field conditions. *Journal of Applied Microbiology*. 111, 939-948
- Orduño-Cruz N, Guzmán-Franco AW, Rodríguez-Leyva E, Alatorre-Rosas R, H. Gonzalez-Hernandez H and Mora-Aguilera G. 2015. In vivo selection of entomopathogenic fungal isolates for control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Biological Control* 90: 1–5.

- Patouillard N. 1892. *Revue Mycologique*, 14, 67-70.
- Pérez-González O, Rodríguez-Villarreal RA, Rodríguez-Guerra R, López-Arroyo JI, Elías Santos M, Maldonado-Blanco MG. 2012. Caracterización de cepas de *Hirsutella* aisladas de *Diaphorina citri* de diferentes estados de México. 3er Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. Veracruz, Veracruz, México, Diciembre 10-12.
- Perez-Gonzalez O, Rodriguez-Guerra R, Lopez-Arroyo JI, Sandoval-Coronado CF, Maldonado-Blanco MG. 2015a. Radial Growth, Sporulation, and Virulence of Mexican Isolates of *Hirsutella citriformis* against *Diaphorina citri*. *Southwestern Entomologist* 40(1) 111:120.
- Posada-Flórez FJ. 2008. Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* in Colombia. *Journal of Insect Science*. 8: 1-13.
- Prakash GVS, Padmaja V, Siva Kiran RR (2008). Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae*. *Bioresource Technology*. 99(6):1530-1537.
- Prior C, Lomer CJ, Herren H, Paraíso A, Kooyman C & Smit JJ. 1992. The IIBC/ IITA/DFPV collaborative research programme on the biological control of locusts and grasshoppers. Pp: 8-18. In: Lomer, C. J. & C. Prior (eds.) *Biological control of locusts and grasshoppers*. Wallingford, Inglaterra. Centre for Agricultural Bioscience International. 394.

- Quesada-Sojo KA, Rivera-Mendez W. 2015. Aislamiento, identificación y patogenicidad de *Hirsutella* en *Planococcus citri*. Tecnología en Marcha. Edición Especial Biocontrol. Pag 74-84
- Qureshi JA, Rogers ME, David G, Hall DG, Stansly PA. 2009. Incidence of invasive *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and Its Introduced Parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Florida citrus. Journal of Economic Entomology 102 (1), 247–256.
- Radha S, Sridevi A, HimaKiran Babu R, Prasad NBL, Narasimha G. 2012. Develop of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation. Journal of Microbiology. Biotechnology Research 2 (1):6-16.
- Rae DJ, LiangWG, Watson DM, Beattie GAC, Huang MD. 1997. Evaluation of petroleum spray oils for control of the Asian citrus psylla, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae), in China. International Journal of Pest Management 43:71–75
- Rakariyatham N, Butr-Indr B, Niamsup H. Shank L. 2006. Improvement of myrosinase activity of *Aspergillus sp.* NR4617 by chemical mutagenesis. Electronic Journal of Biotechnology, North America, 915 07.
- Reyes-Martínez AY, Casique-Valdés R, Lopez-Arroyo JI, Sánchez-Peña SR. 2010. Aspectos biológicos y ecológicos del hongo *Hirsutella* patógeno de *Diaphorina citri* en Tamaulipas. 1er Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psíllido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México, Monterrey, Nuevo León, México, Diciembre 8-9.

- Ribeiro O, Magalhães F, Aguiar TQ, Wiebe MG, Penttilä M, and Domingues L. 2013. Random and direct mutagenesis to enhance protein secretion in *Ashbya gossypii*. *Bioengineered* 4:5, 322–331.
- Rivero-Aragon A, Grillo-Ravelo H. 2000. Natural enemies of *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) in the central region of Cuba. *Centro-Agricola* 27(3):87–88.
- Romero-Rangel O, Maldonado-Blanco MG, Aguilar-López CC, Elías-Santos M, Rodríguez Guerra R, López-Arroyo JI. 2012. Production of mycelium and blastospores of *Hirsutella* sp. in submerged culture. *African Journal of Biotechnology* 11:15336-15340.
- Rosas-Acevedo JL, Alatorre R, y Valdez J. 1995. Pathogenicity bioassays of *Hirsutella thompsonii* Fisher and *H. nodulosa* Petch 1 in mixed cultures. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 37:59-64.
- Rosas-Acevedo JL, Alatorre R, Valdez J. y Sampedro L. 1994. Crecimiento micelial y esporulación de siete cepas de *Hirsutella thompsonii* y una cepa de *H. nodulosa* en seis medios líquidos. *Agro. serie Protección Vegetal*. 5 (1):91-101
- Ruiz CE, Coronado JMB and Myartseva SN. 2006. Situación actual del manejo de las plagas de los cítricos en Tamaulipas, México. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* 78:94-100.
- Ruiz CE, Coronado JMB, and Myartseva SN. 2004. The Asian citrus psyllid in Mexico. 52nd Annual Meeting of the Entomological Society of America. Salt Lake City, Utah.

- Sahayaraj K, Karthick S. 2008. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and byproducts. *African Journal of Biotechnology*. 7(12):1907-1910.
- Salcedo D, Hinojosa H, Mora G, Covarrubias I, DePaolis F, Cíntora C, Mora S. 2010. Evaluación del impacto económico de Huanglongbing (HLB) en la cadena citrícola mexicana. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Samson RA. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies of Mycology*. 6: 1-119.
- Sánchez BM. 2010. Biología, ecología y control de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Tesis de doctorado en ciencias. Colegio de Postgraduados, México. Pp 46
- Sánchez-Peña SR, Casique-Valdés R, Bidochka M, Reyes-Martínez AY, López-Arroyo JI. 2011. *Hirsutella citrifomis*: Caracterización Morfológica y Molecular y Patogenicidad hacia Psylloideos vectores. 2° Simposio Nacional sobre investigaciones para el manejo del Psyllido Asiático de los Cítricos y Huanglongbing en México, Texcoco, Estado de México, México, Diciembre 5-6.
- Secretaría de Agricultura, 2013. Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Published online at <http://www.siap.gob.mx/>.
- Sega GA, 1984. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutation Research*, 134 113-142. Elsevier.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2011. <http://www.senasica.gob.mx> [Revisado el 11 de Octubre de 2011].

- Shafique S, Bajwa R, Shafique S. 2009. Mutation of *Alternaria tenuissima* FCBP-252 for hyper-active α -amylase. Indian Journal of Experimental Biology. Vol 47, pp 591-596.
- Shipton WA. 2014. The Biology of Fungi impacting Human Health. A tropical Asia-Pacific Perspective.
- Shivanna GB and Govindarajulu V. 2009. Screening of asporogenic mutants of phytase-producing *Aspergillus niger* CFR 335 strain. Microbial Ecology in Health and Disease. 21: 57-63.
- Sreedevi K, Venkateswara RJ, Lakshmi N, Fareedullah Md. 2011. Strain improvement of *Aspergillus terreus* for the enhanced production of lovastatin, a HMG-COA reductase inhibitor Journal of Microbiology Biotechnology Research. 1 (2):96-100.
- Sneh B, Burpee L, y Ogoshi A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. The American Phytopathological Society. 133.
- Subandiyah S, Nikoh N, Sato H, Wagiman F, Tsuyumyu S, Fukatsu T. 2000. Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera, Psylloidea) in Indonesia. Mycoscience 41: 509–513.
- Summet S. y Oliver H. 2009. Genome-gate: digging up dirt in EMS-mutagenized strains. The worm breeder's gazette. Volume 18 Number 1.
- Sung GH, Nigel L, Hywel-Jones, Jae-Mo S, Luangsa-ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. Studies in Mycology 57: 5-59 doi:10.3114/sim.2007.57.01.

- Tanada, Y. y H. Kaya. 1993. Insect Pathology. Academic Press. Inc., San Diego.
- Tanaka FAO, Coletta-Filho HD, Alves KCS, Spinelli MO, Machado MA, Kitajima EW. 2007. Detection of the “*Candidatus Liberibacter americanus*” in Phloem Vessels of Experimentally Infected *Cataranthus roseus* by Scanning Electron Microscopy. *Fitopatologia Brasileira*. 32(6).
- Tatineni S. Sagaram US, Gowda S, Robertson CJ, Dawson WO, Iwanami T, Wang N. 2008. In plant distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and realtime PCR. *Hytopathology* 98:592-599.
- Texeira DC, Ayres J, Kitajima EW, Danet L, Jagoueix-Eveillard S, Saillard C. 2005. First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species.
- Tsai, J. H. & Liu, Y. A. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. *Journal of Economic Entomology*, 93:1721-1725.
- Thohirah A, Hajivand S, Kamaruzaman S, Siti Nor AA. 2009. Control of Huanglongbing (HLB) disease with reference to its occurrence in Malaysia. *African Journal of Biotechnology*. 8(17):4007-4015.
- Thomas MB and Read AF. 2007. Fungal bioinsecticide with a sting. *Nature Biotechnology*, 25, 1367–1368. Doi: 10.1038/nbt1207-1367.
- Toledo AV, Humber RA, López Lastra CC. 2008. First and southernmost records of *Hirsutella* (Ascomycota: Hypocreales) and *Pandora* (Zygomycota: Entomophthorales) species infecting Dermaptera and Psocodea. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 193–196.

Vega FE, Jackson MA, Mercadier G, Poprawski TJ. 2003. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 19: 363- 368.

Veerapague M, Jeya KR, Ponmurugan K. Mutational. 2008. Effect of *Penicillium chrysogenum* on Antibiotic Production. *Advanced Biotech*, 16-19.

Wang H, Chen G, Lin H, Gong J. 2002. Studies on the population dynamics of citrus pests and diseases and control methods. *South China Fruits* 31(4): 13–15.

Winkelhoff AJ and McCoy CW. 1984. Conidiation of *Hirsutella thompsonii* var. *synnematosa* in submerged culture. *Journal of Invertebrate Pathology*. 43:5968.

Zabriskie DW and Zabriskie DH 1980 *Trader's Guide to Fermentation Media Formulation*. *Trader's Oil Mill Co., Ft Worth, TX*

Material Electrónico

1. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre
<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Link=T&TableKey=14682616000000063&Rec=14953&Fields=All> [Revisado el 29 de Julio de 2014.
2. (FAO, 2017 <http://www.fao.org/docrep/009/ah645s/AH645S04.htm>)

12. FIGURAS

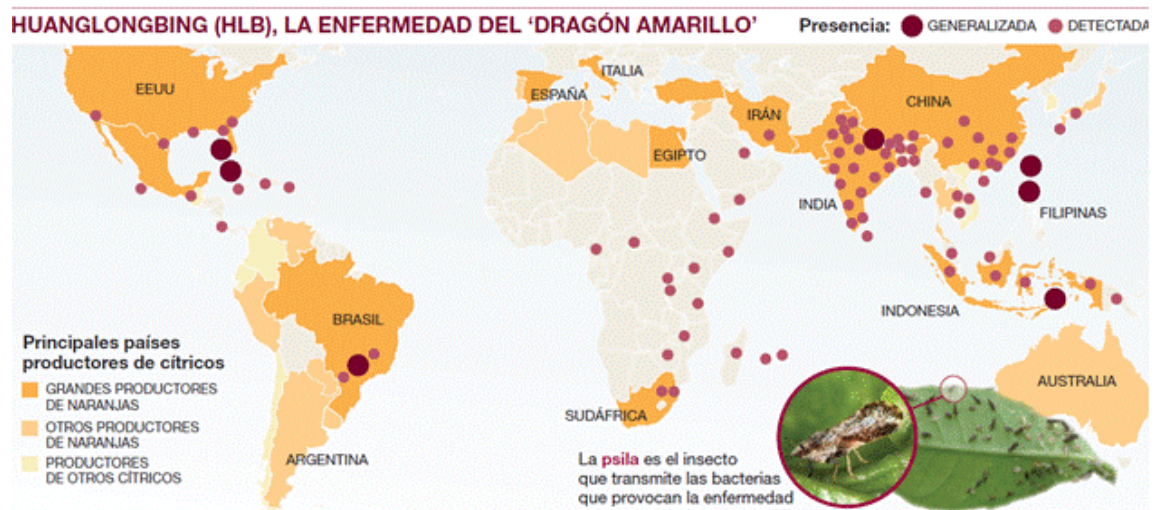


Figura 1. HLB en el Mundo. (Fuente: Cantazaro M. 2013)

(Tomado de: http://www.diariocordoba.com/noticias/sociedad/ue-blinda-mal-arrasa-citricos-mundo_826099.html)

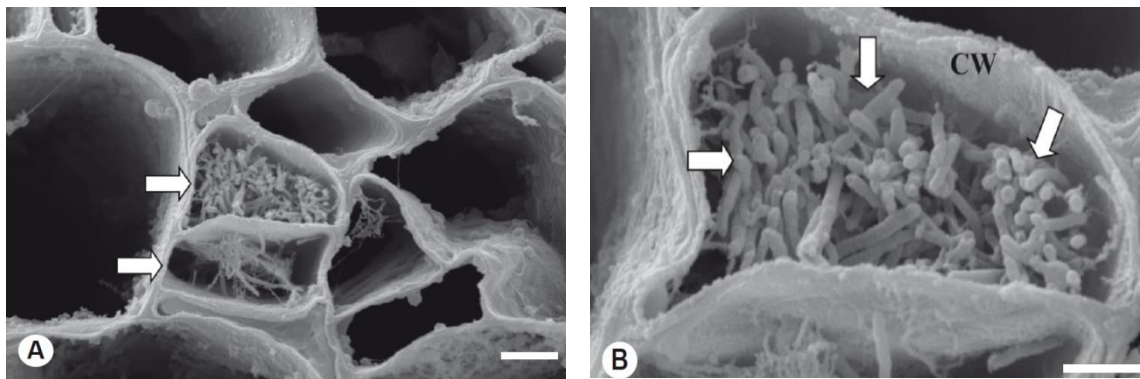


Figura 2. Micrografía electrónica de barrido de los vasos del floema (Flechas). Sección transversal de una hoja, infectados experimentalmente por *Candidatus Liberibacter americanus*. (Tomado de: Tanaka et al. 2007)



Figura 3. Síntomas de la enfermedad Huanglongbing. 2010



Figura 4. Distribución de Huanglongbing (HLB) en México. (Tomado de: SENASICA 2011 <http://www.senasica.gob.mx/?id=4608>)



Figura 5. Principales productores de cítricos en el mundo (Fuente: FAO 2010-2011)

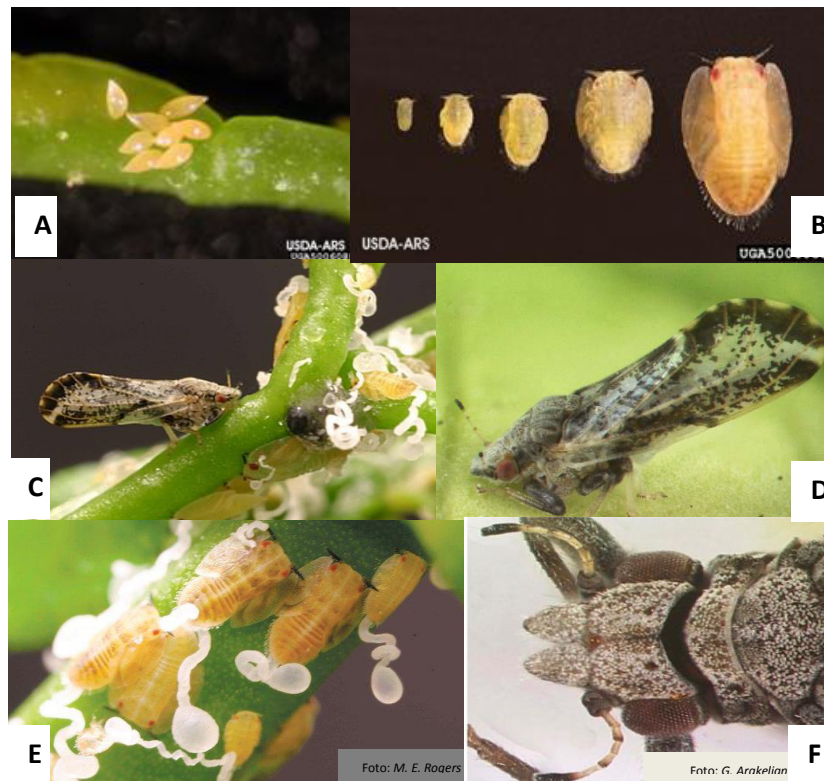


Figura 6. **A.** Huevos de PAC en forma de balón de fútbol. **B.** Los cinco estados ninfales de PAC. **C.** Adultos y ninfas con túbulos cerosos característicos. **D.** Adulto *Diaphorina citri*. **E.** Ninfas con túbulos cerosos. **F.** Parte frontal de *Diaphorina citri*

(Tomado de: Fotos: (A, B, C, D) David Hall, USDA Agricultural Research Service y (E) Foto por Michael Rogers, Universidad de Florida. F) Foto por G. Arakelian (Fuente: Florida Department of Agriculture and Consumer Services y Senasica)



Figura 7. Distribución en México de *Diaphorina citri*.
(Tomado de: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4608>)



Figura 8. *Diaphorina citri* micosado por *Hirsutella citriformis*.
(Tomado de: Hall et al. 2012)

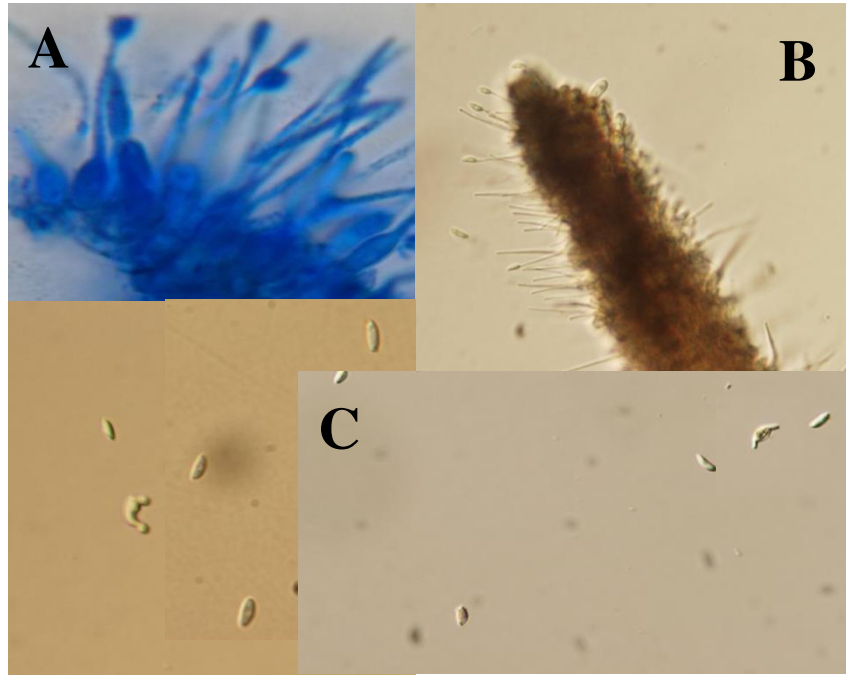


Figura 9. Estructura morfológica de *Hirsutella citriformis* INIFAP-Hir- 2. **A** Fiálides con su base bulbosa. **B** Sinema. **C** Conidios. Fotos de autora.

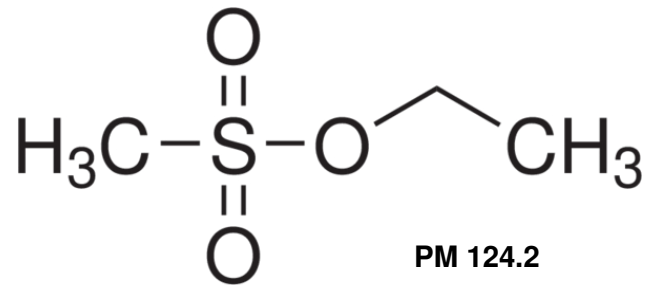


Figura 10. Estructura del EMS
(Tomado de: Report on Carcinogens. 2011)

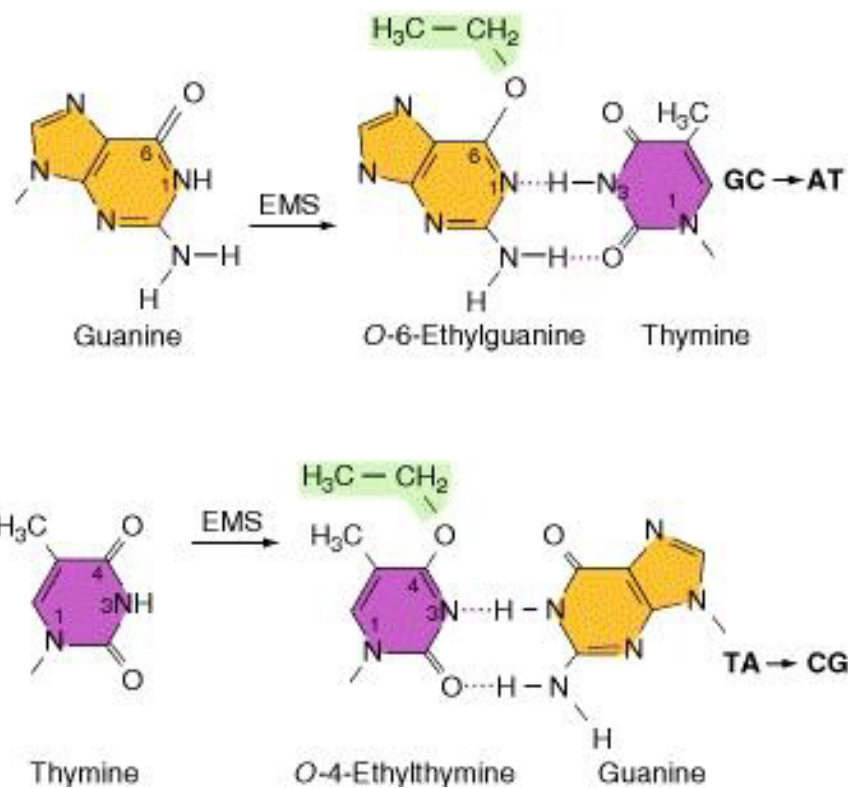


Figura 11. Alquilación de la Guanina (Tomado de Russell 1998).
<http://biosiva.50webs.org/dam.htm>

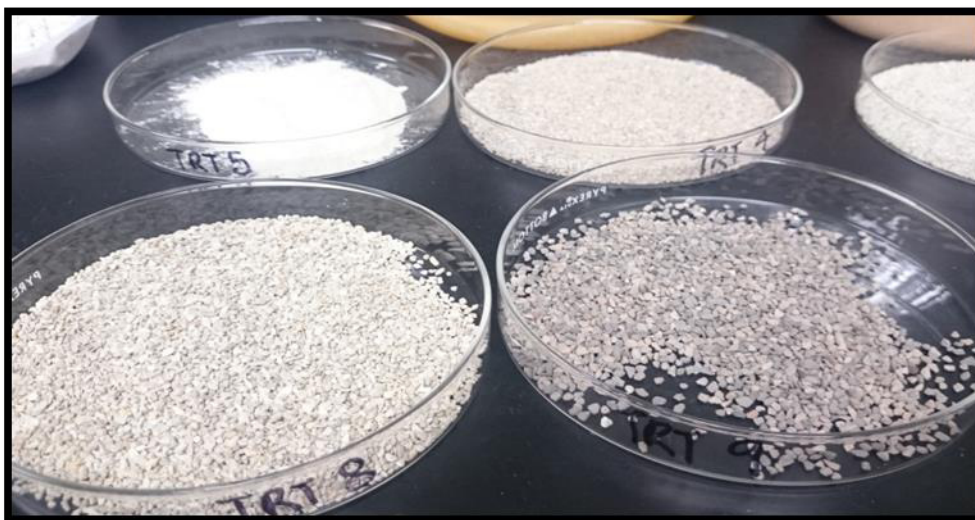


Figura 12. Arcillas granulares proporcionadas por OIL DRY corporation of America, utilizadas como soportes inorgánicos para la realización de formulados secos de *H. citrifomis* INIFAP-Hir-2. (<http://www.oildri.net/Granular.html>)



Figura 13. Unidad experimental utilizada en la realización de los bioensayos, cada recipiente contó con hule espuma humectado. **A.** recipiente de plástico capacidad 150mL de seis centímetros de altura y ocho centímetros diámetro superior. **B.** hoja de cítrico para alimento de liviidos. **C.** Tapa modificada (Malla para evitar salida de adultos).



Figura 14. Cámara húmeda utilizada para inducir el micosamiento de insectos tratados muertos.



Figura 15. Cámara Húmeda utilizada para secado de las formulaciones con arcillas.

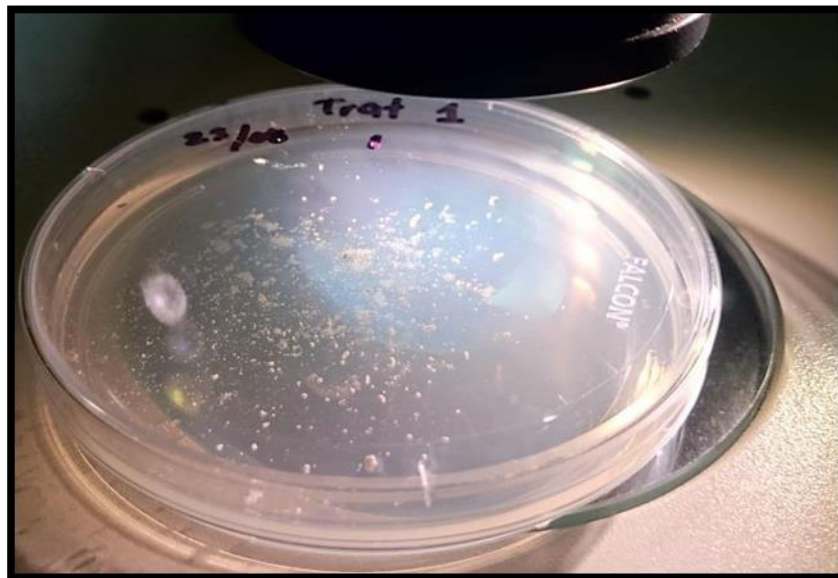


Figura 16. Arcilla observada bajo estereoscopio para la evaluación del porcentaje de germinación

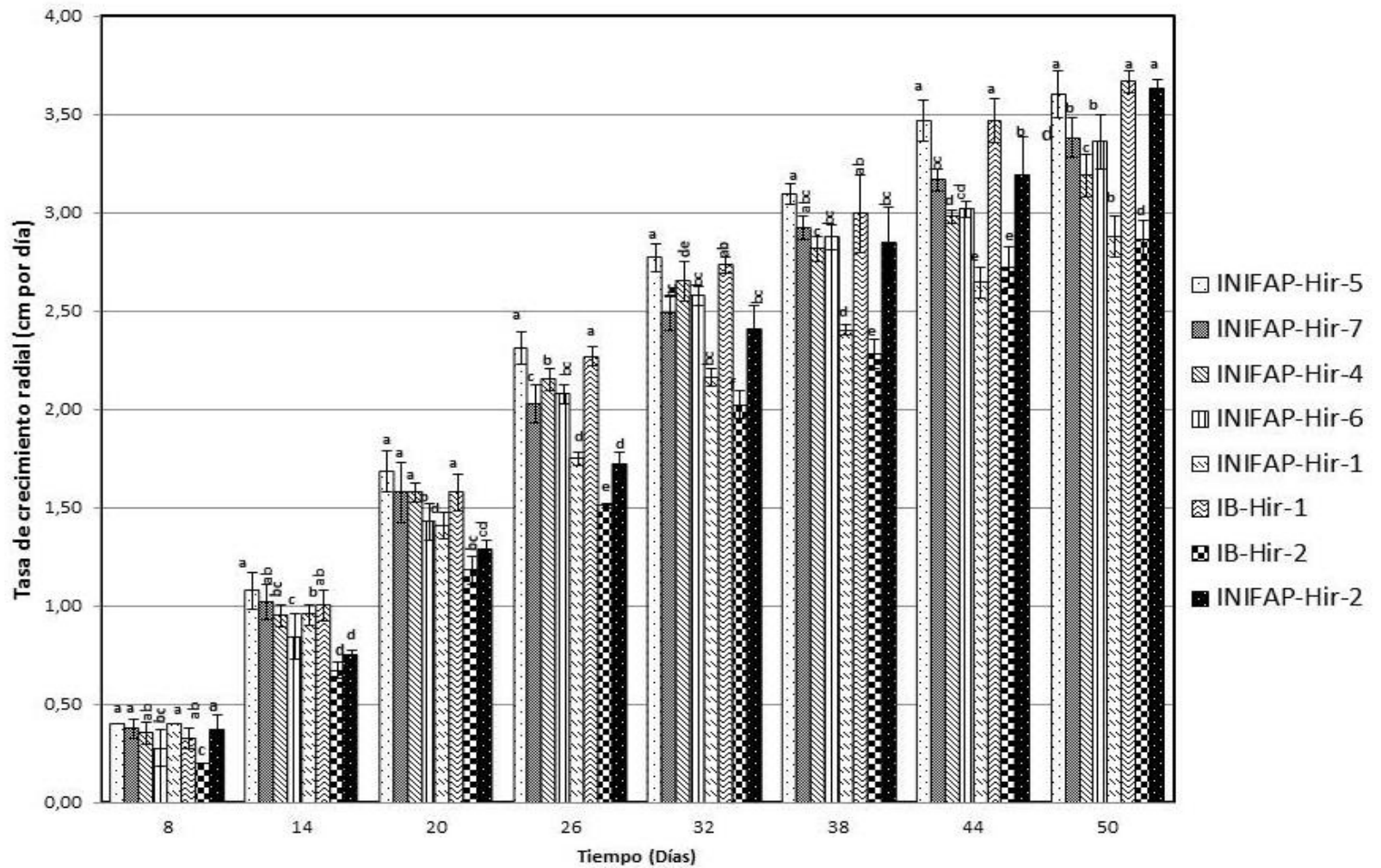


Figura 17. Tasa de crecimiento radial (cm) de 8 cepas silvestres de *Hirsutella citriformis* sobre PDA. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las cepas en cada día registrado (Tukey, $p < 0.05$).

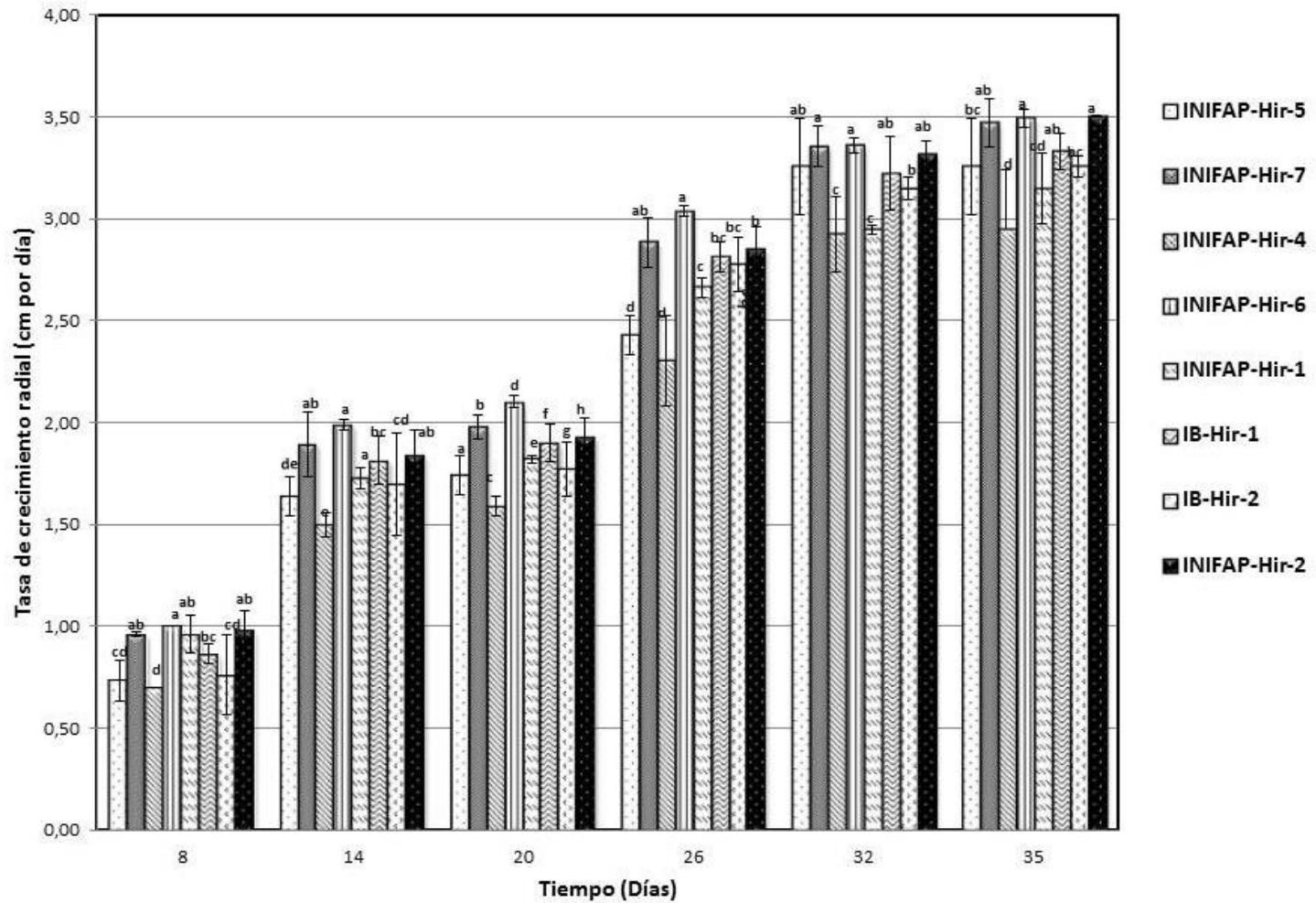


Figura 18. Tasa de crecimiento radial (cm) de *Hirsutella citriformis* silvestre sobre PDA (Agar papa dextrosa) adicionado con extracto de levadura al 0.5% Letras diferentes indican diferencia significativa entre las cepas (Tukey, $p < 0.05$) en el día registrado.

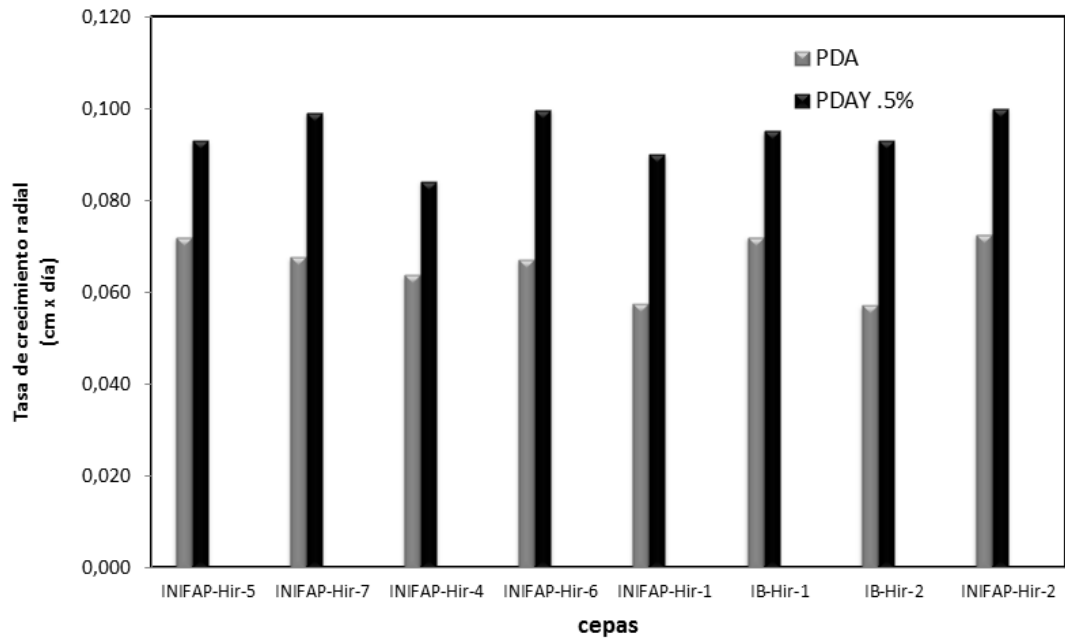


Figura 19. Comparación de tasa de crecimiento radial de cepas de *H. citriformis* cultivadas en PDA y PDAY al 0.5 %.

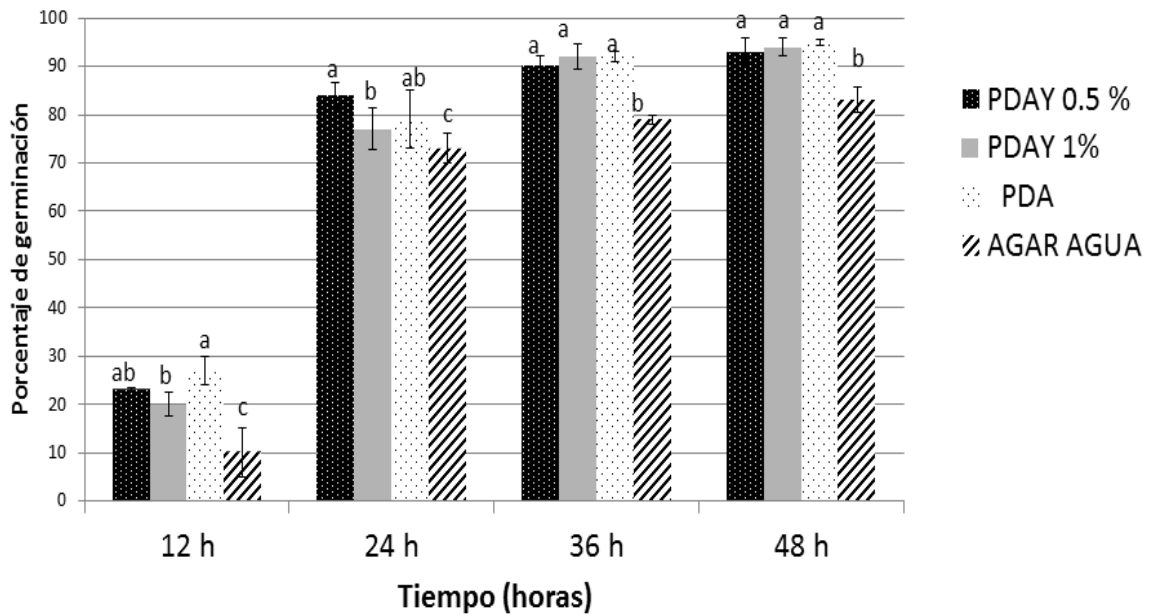


Figura 20. Porcentaje de germinación de INIFAP-Hir-2 sobre cuatro diferentes medios. ANOVA, Tukey 0.05. Letras diferentes indican diferencia significativa dentro de cada tiempo.

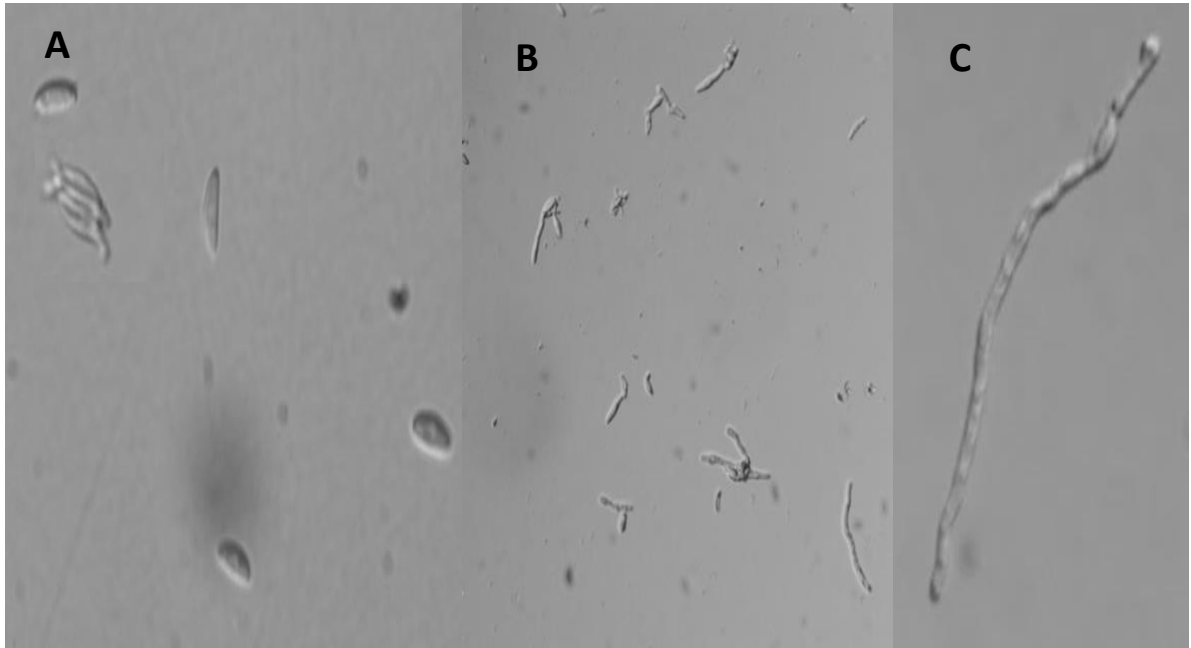


Figura 21. Germinación de INIFAP-Hir-2. **A.** Conidios en tiempo cero. **B.** Conidios a las 24 horas. **C.** conidios a las 48 horas. Vistas al microscopio de luz con el objetivo de 40X

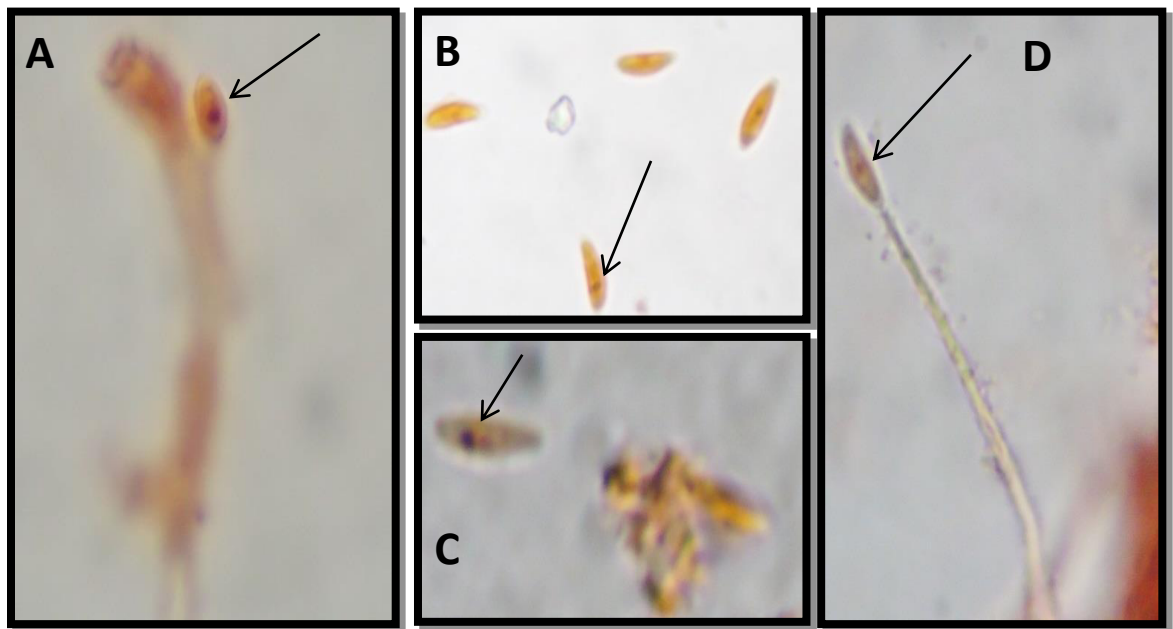


Figura 22. Verificación del número de núcleos existentes en los conidios de INIFAP-Hir-2. Diferentes vista al microscopio de luz con el objetivo **A** 100x, **B** 40x, **C** 100x y **D** 40x.

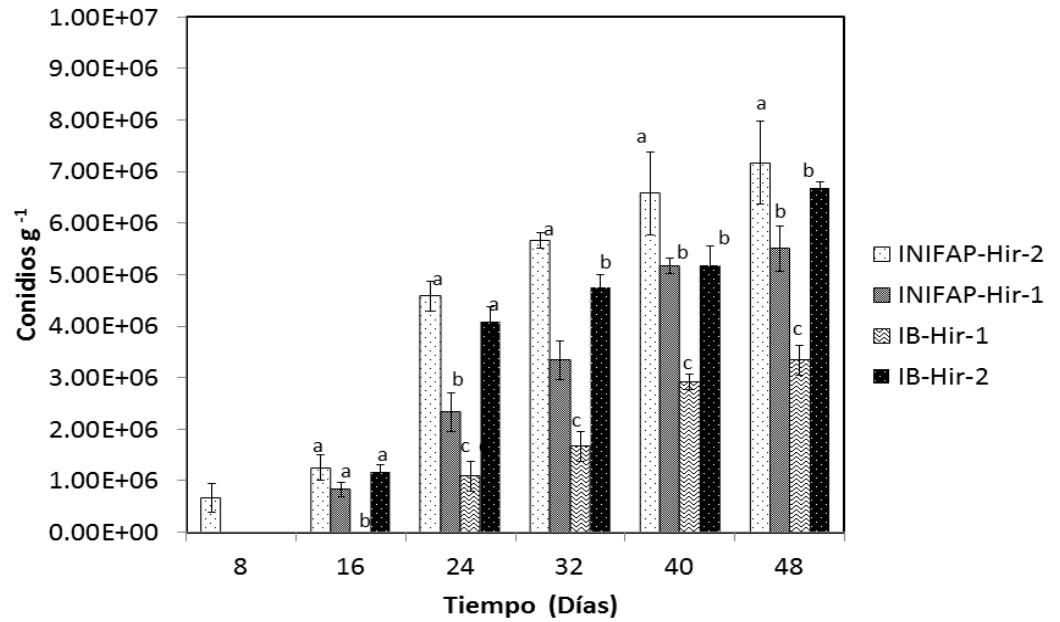


Figura 23. Producción de conidios por cepas de *H. citriformis* en el sustrato **sorgo**, a partir de un inóculo crecido en medio líquido de casaminoácidos. (Letras diferentes indican diferencia significativa entre las cepas en cada día de muestreo, ANOVA, Tukey 0.05).

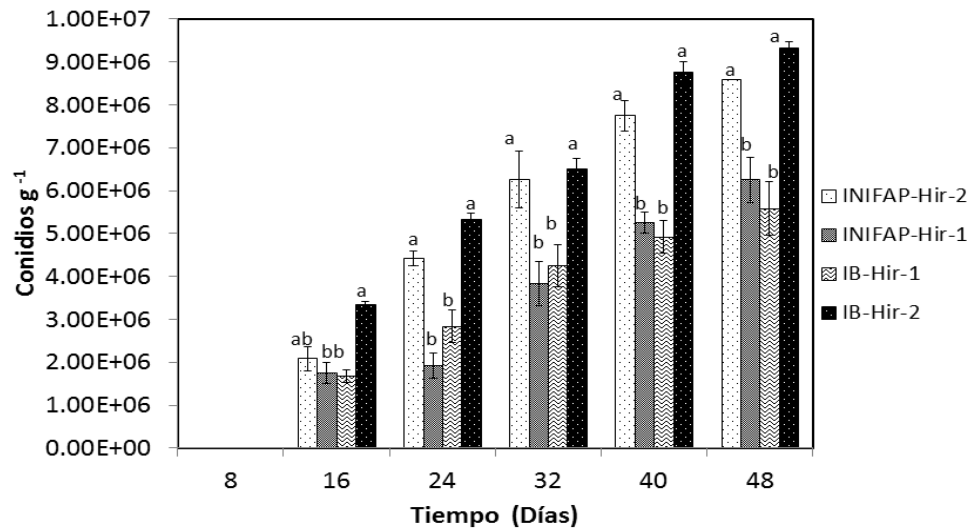


Figura 24. Producción de conidios por cepas de *H. citriformis* en el sustrato **avena**, a partir de un inóculo crecido en casaminoácidos. (Letras diferentes indican diferencia significativa entre las cepas en cada día de muestreo, ANOVA, Tukey 0.05).

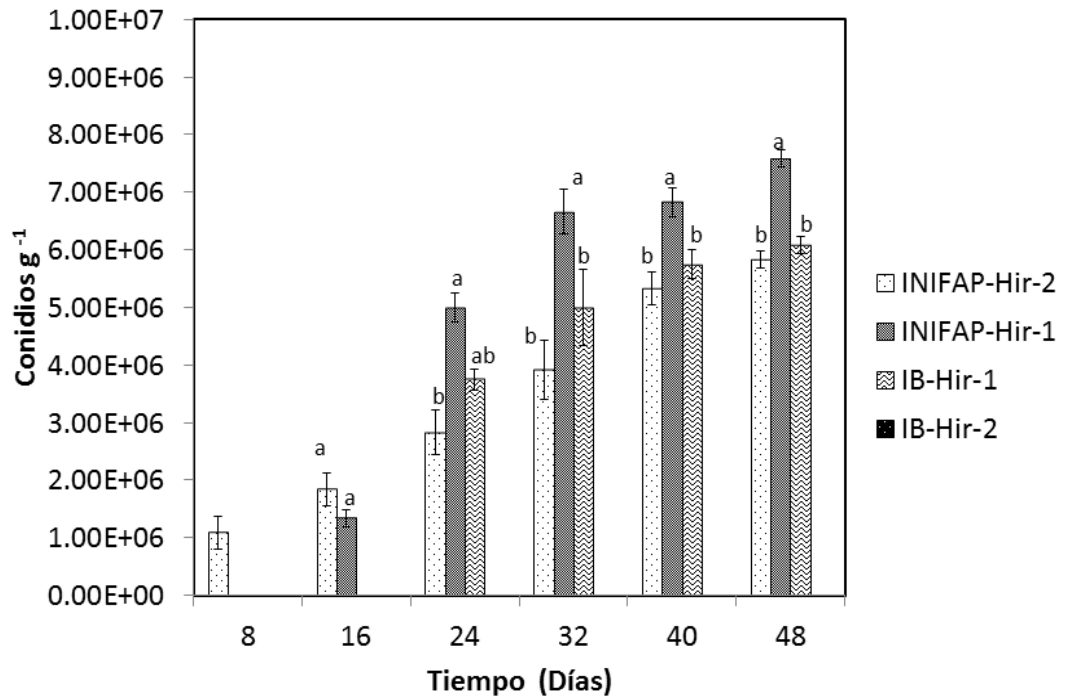


Figura 25. Producción de conidios por cepas de *H. citriformis* en el sustrato arroz, a partir de un inóculo crecido en casaminoácidos. (Letras diferentes indican diferencia significativa entre las cepas en cada día de muestreo, ANOVA, Tukey 0.05).

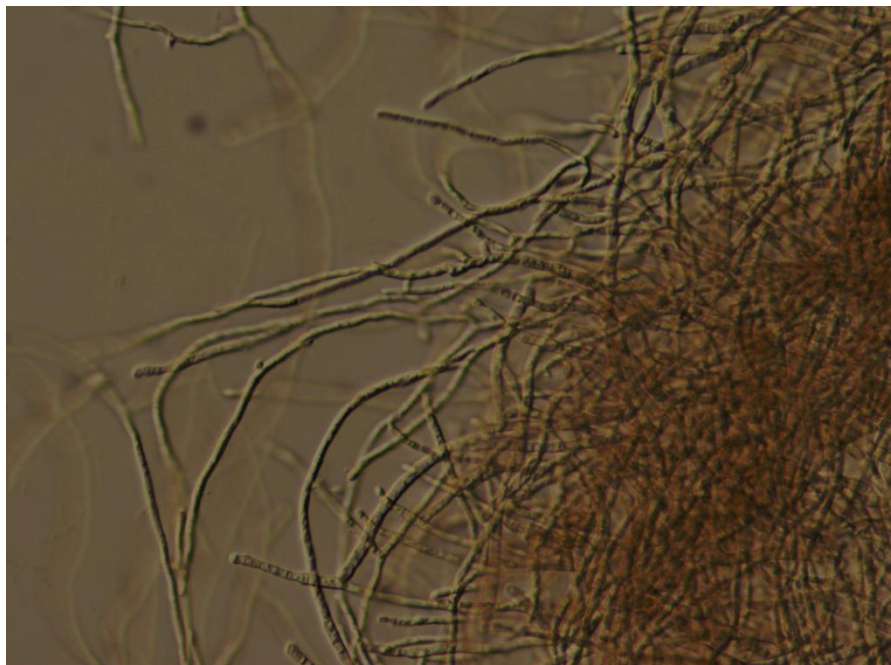


Figura 26. Micelio de la cepa INIFAP-Hir-2

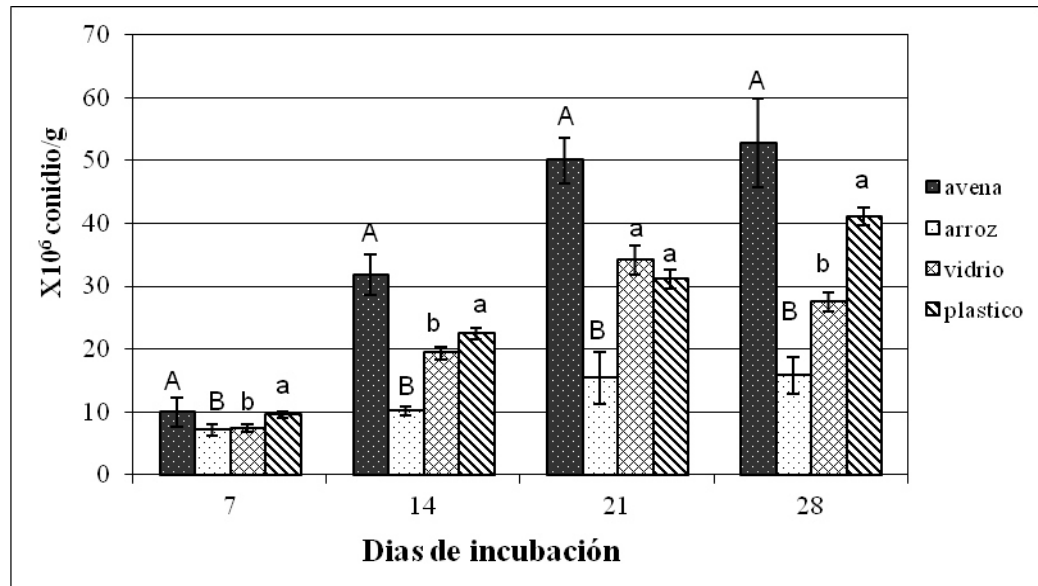


Figura 27. Evaluación de la producción de conidios de *H. citriformis* INIFAP-Hir-2 en dos diferentes sustratos, Arroz y Avena (letras mayúsculas) bajo condiciones de laboratorio ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), utilizando dos recipientes: Vidrio y Plástico (letras minúsculas). Los tratamientos con diferente letra son significativamente diferentes. ($p\leq 0.05$) en cada día de muestreo.

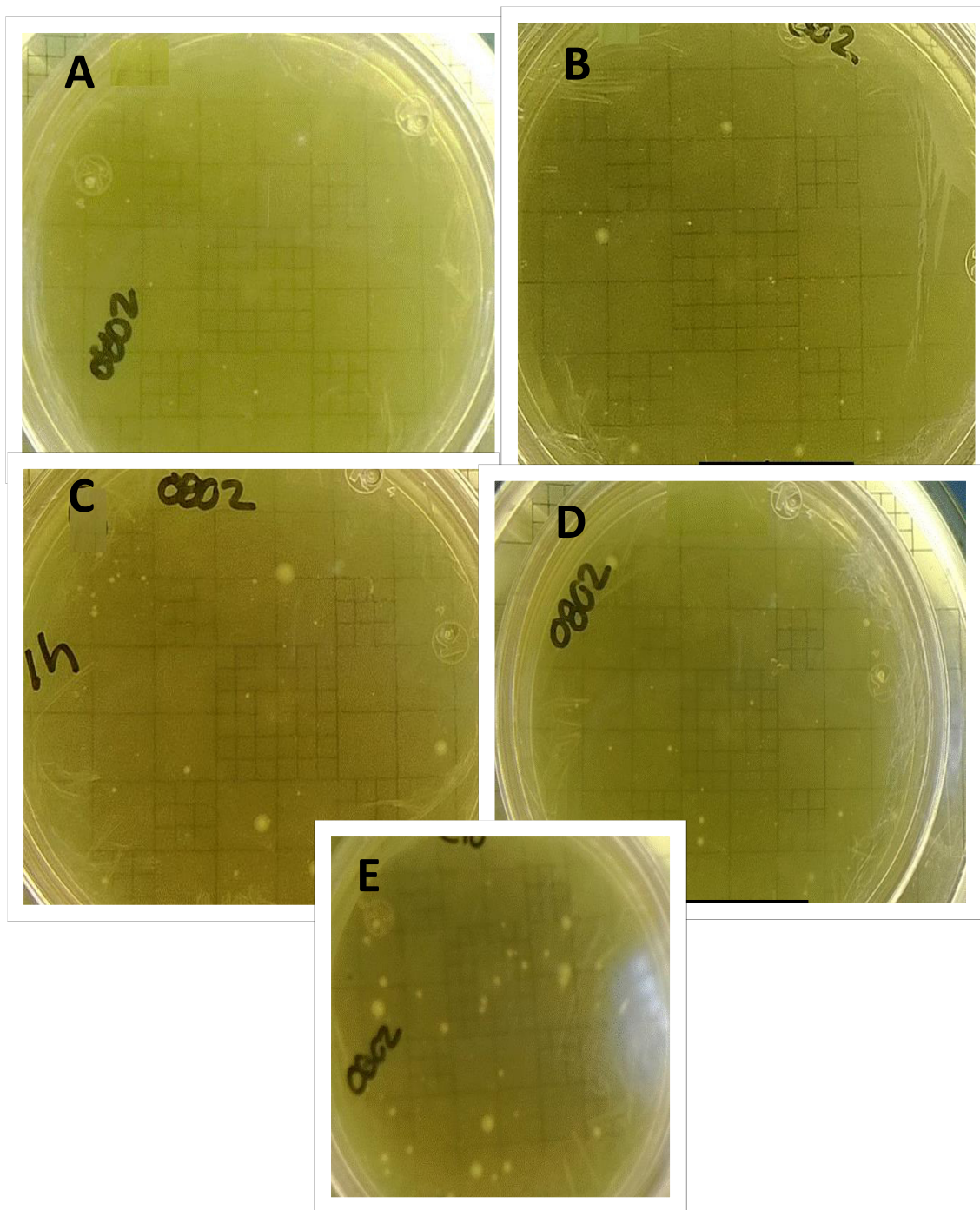


Figura 28. Desarrollo de colonias de mutantes de *H. citriformis* después de diferentes tiempos y dosis de exposición a metanosulfonato de etilo, a los 15 días de inoculación. **A** 5 000 $\mu\text{l}/\text{mL}$ durante 60 minutos; **B**. 5 000 $\mu\text{l}/\text{mL}$ durante 180 minutos; **C**. 10 000 $\mu\text{l}/\text{mL}$ durante 60 minutos; **D**. 10 000 $\mu\text{l}/\text{mL}$ durante 180 minutos y **E**. Control.

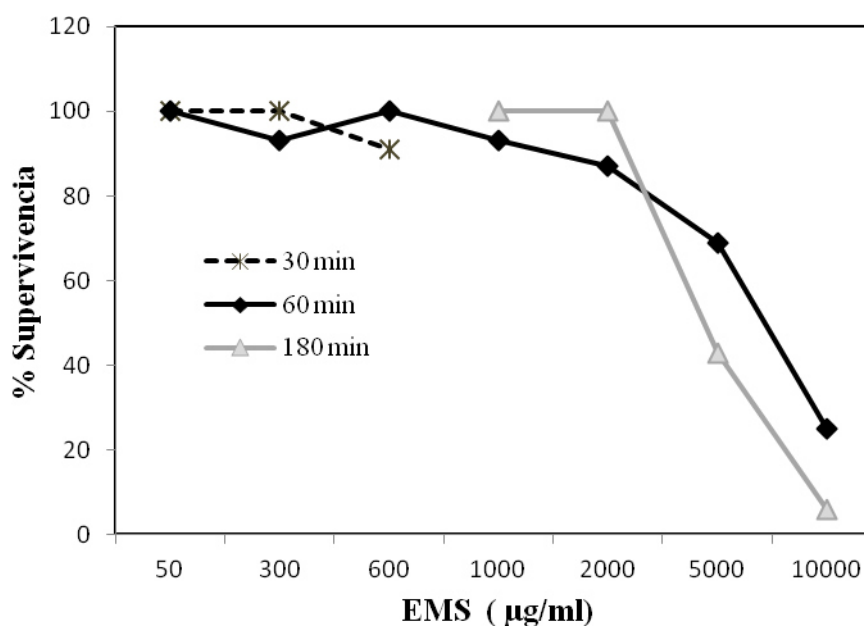


Figura 29. Porcentaje de supervivencia de colonias de *Hirsutella citriformis*, utilizando diferentes concentraciones y tiempos de exposición a metanosulfonato de etilo.

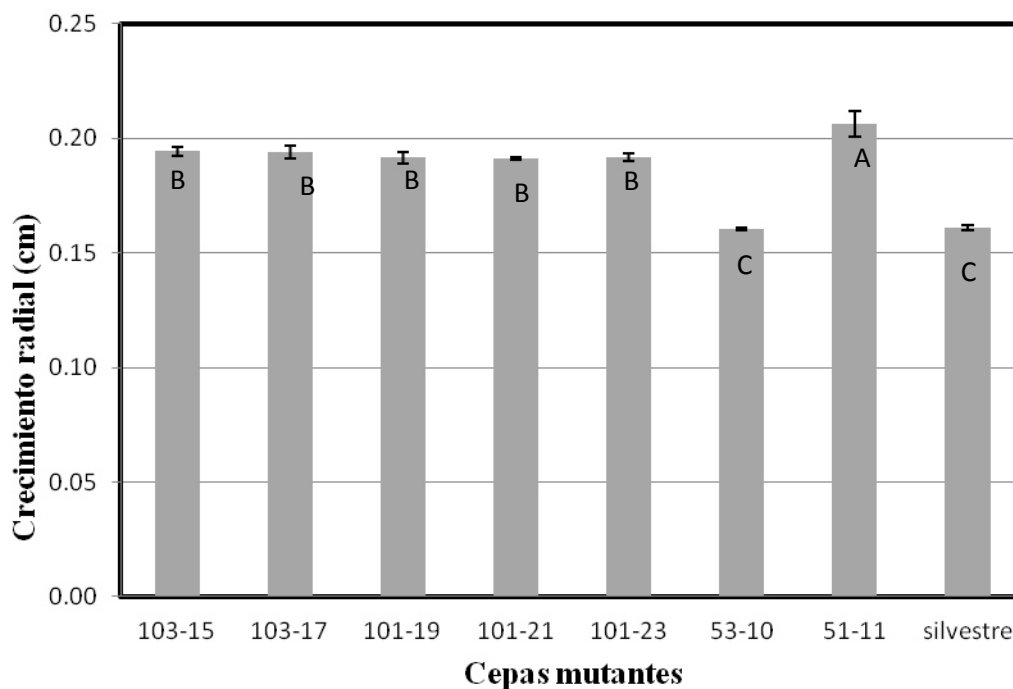


Figura 30. Crecimiento radial de las cepas mutantes seleccionadas y cepa silvestre de *H. citriformis* INIFAP-Hir-2.

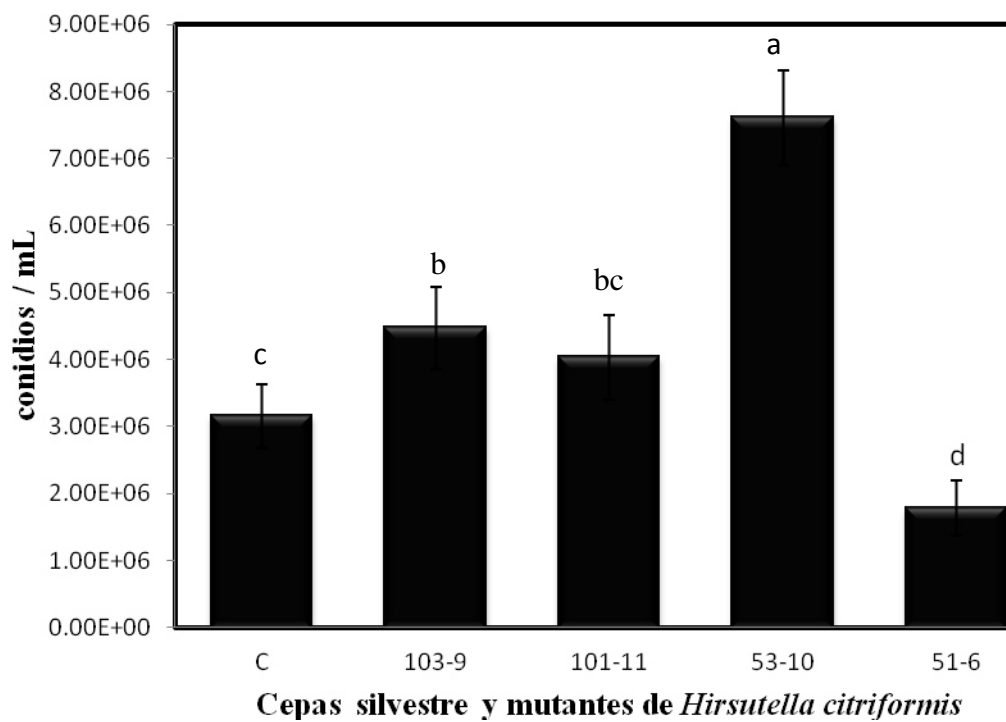


Figura 31. Producción de conidios de la cepa silvestre (C) y mutantes de *Hirsutella citriformis* INIFAP-Hir-2 sobre medio PDAY posterior a 6 semanas de incubación a 25°C. Letras diferentes indican diferencia significativa determinada a través de ANOVA y análisis de Tukey a 0.05.

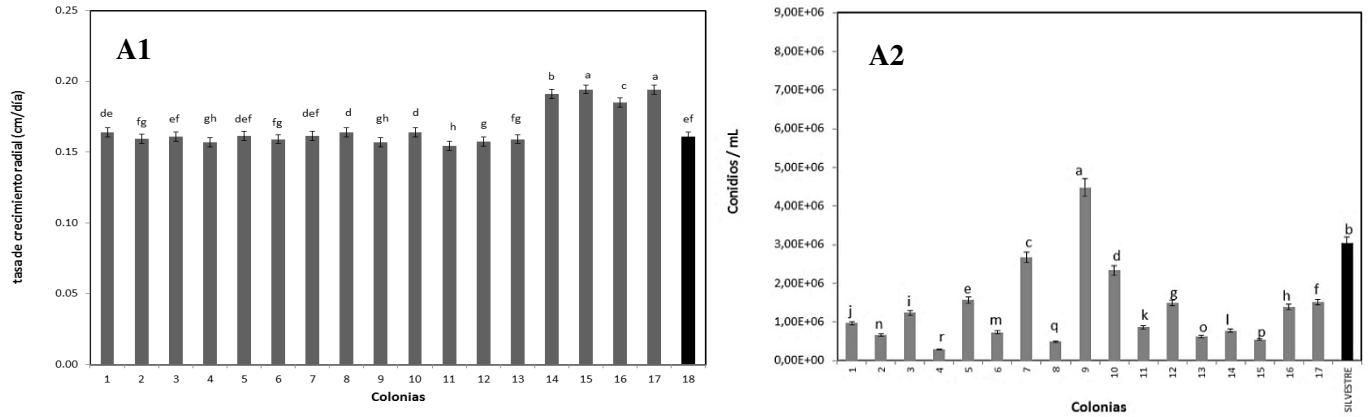


Figura 32A. Crecimiento radial y producción de conidios de cepas mutantes y silvestre de *Hirsutella citriformis* INIFAP-Hir-2, sobre PDA más extracto de levadura al 1% a las seis semanas de evaluación con la dosis 10 000 µg/ml durante tres horas. **A1.** Tasa de crecimiento radial. **A2.** Producción de conidios

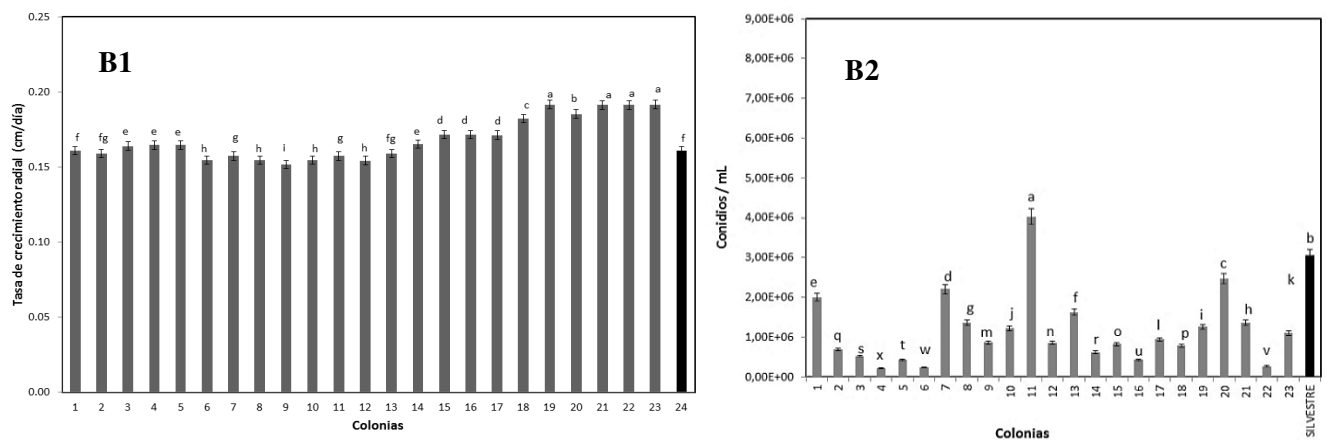


Figura 32B. Crecimiento radial y producción de conidios de cepas mutantes y silvestre de *Hirsutella citriformis* INIFAP-Hir-2, sobre PDA más extracto de levadura al 1% a las seis semanas de evaluación con la dosis 10 000 µg/ml durante una hora **B1.** Tasa de crecimiento radial. **B2.** Producción de conidios

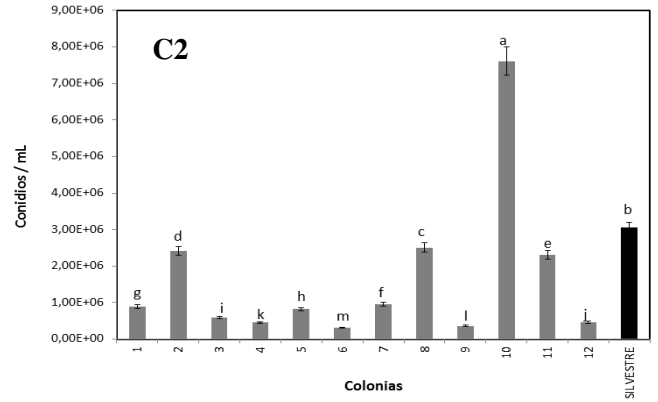
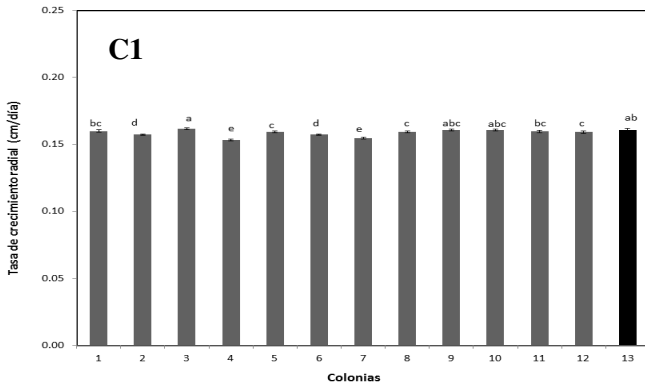


Figura 32C. Crecimiento radial y producción de conidios de cepas mutantes y silvestre de *Hirsutella citrifomis* INIFAP-Hir-2, sobre PDA más extracto de levadura al 1% a las seis semanas de evaluación con la dosis 5 000 $\mu\text{g/ml}$ durante tres horas **C1**. Tasa de crecimiento radial. **C2**. Producción de conidios.

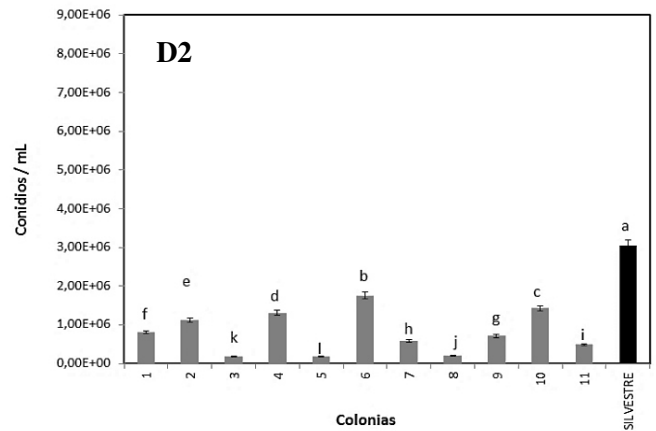
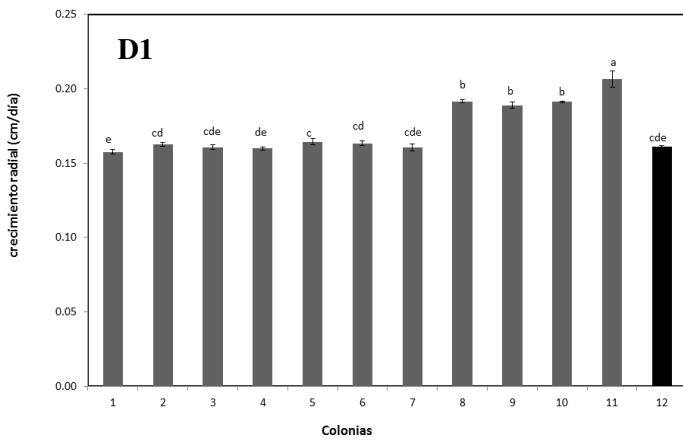


Figura 32D. Crecimiento radial y producción de conidios de cepas mutantes y silvestre de *Hirsutella citrifomis* INIFAP-Hir-2, sobre PDA más extracto de levadura al 1% a las seis semanas de evaluación con la dosis 5 000 $\mu\text{g/ml}$ durante una hora **D1**. Tasa de crecimiento radial. **D2**. Producción de conidios.

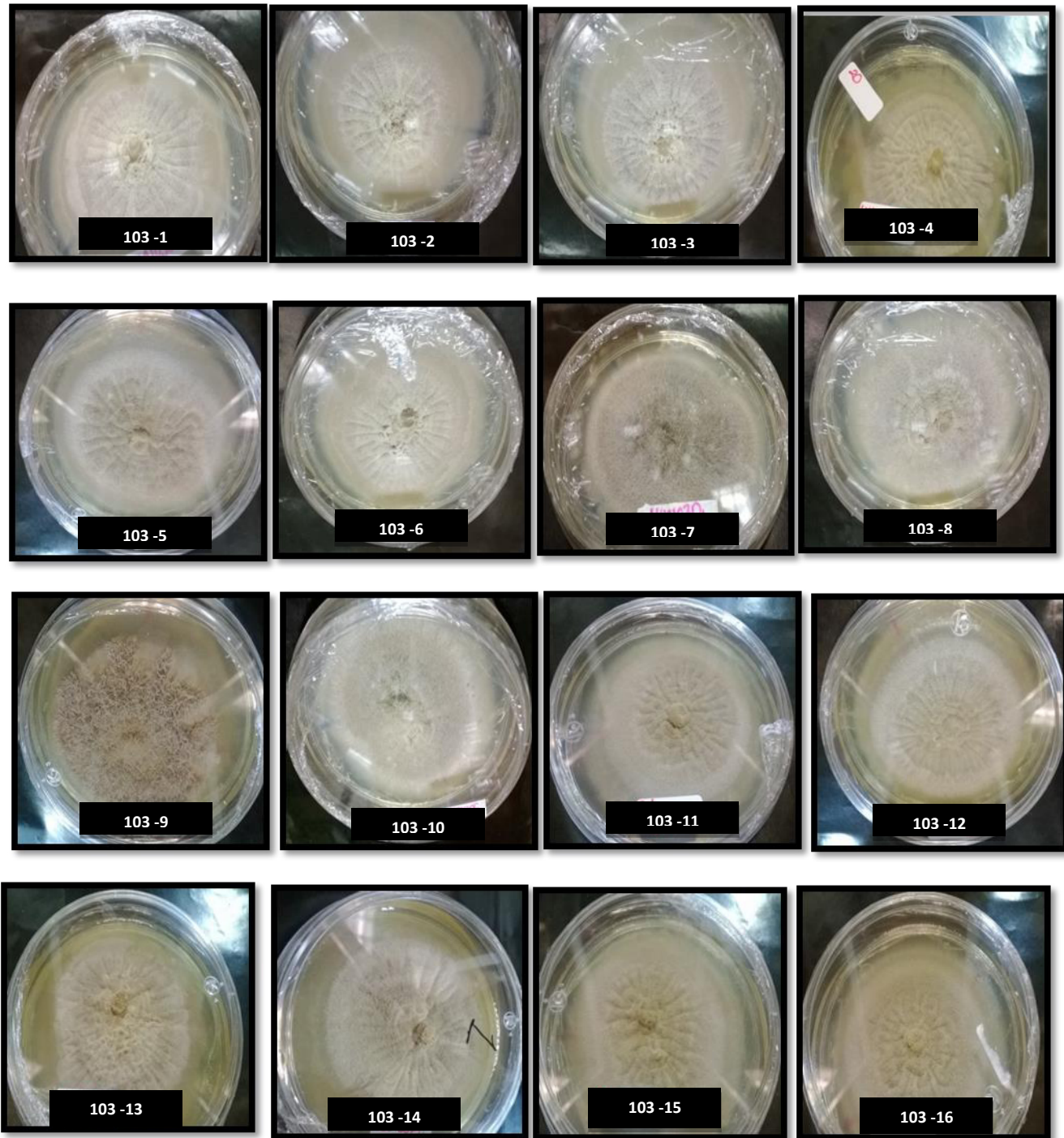


Figura 33. Cambios fenotípicos de mutantes de *Hirsutella citriformis* INIFAP-Hir-2 sobre $\mu\text{g/ml}$ durante tres horas.

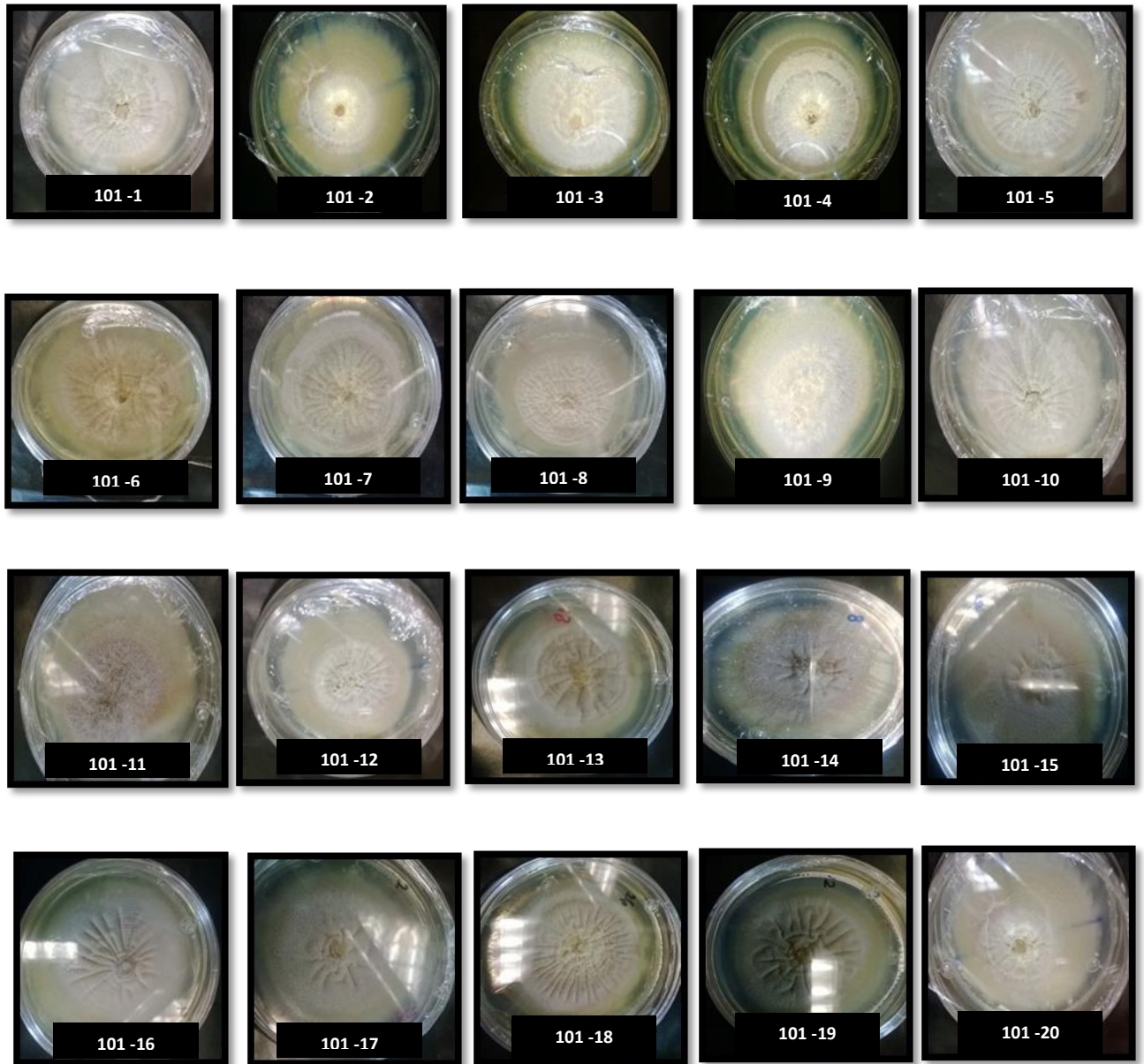


Figura 34. Cambios fenotípicos de mutantes de *Hirsutella citriformis* INIFAP-Hir-2 sobre PDA más extracto de levadura al 1% a las seis semanas de evaluación con la dosis 10 000 $\mu\text{g/ml}$ durante una hora.

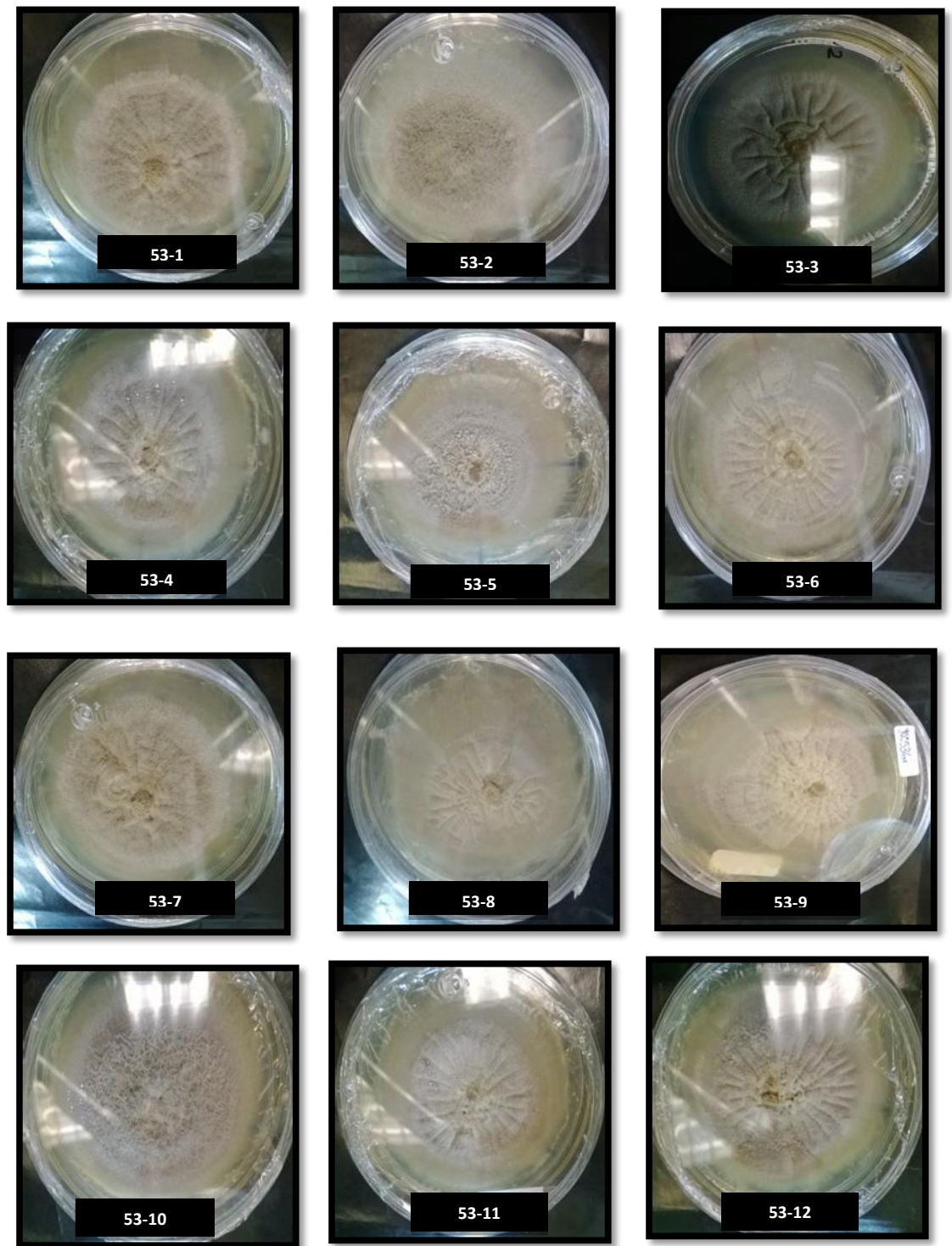


Figura 35. Cambios fenotípicos de mutantes de *Hirsutella citriformis* INIFAP-Hir-2 sobre PDA más extracto de levadura al 1% a las seis semanas de evaluación con la dosis 5 000 $\mu\text{g/ml}$ durante tres horas.

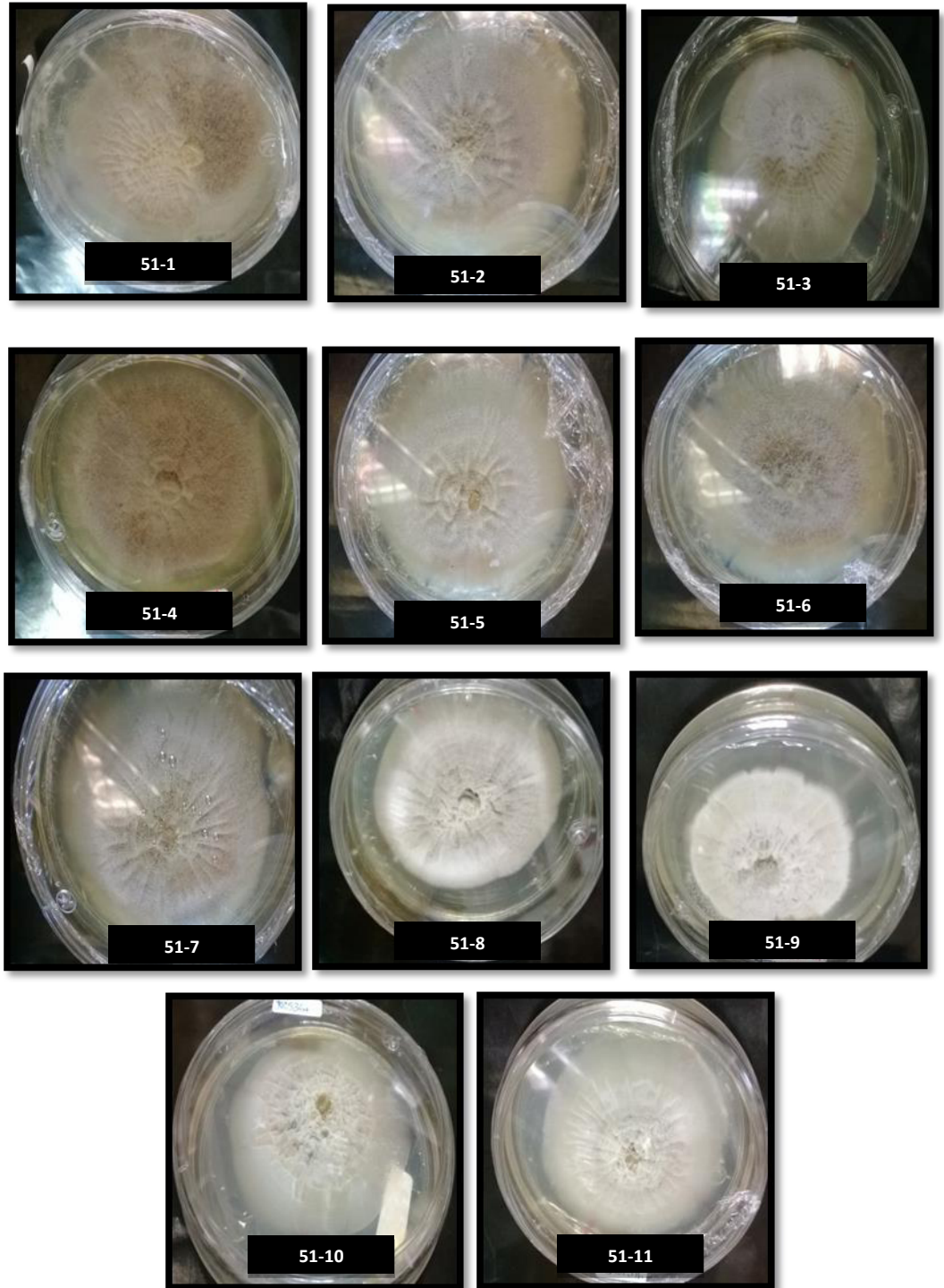


Figura 36. Cambios fenotípicos de mutantes de *Hirsutella citriformis* INIFAP-Hir-2 sobre PDA más extracto de levadura al 1% a las seis semanas de evaluación con la dosis 5 000 µg/ml durante una hora.

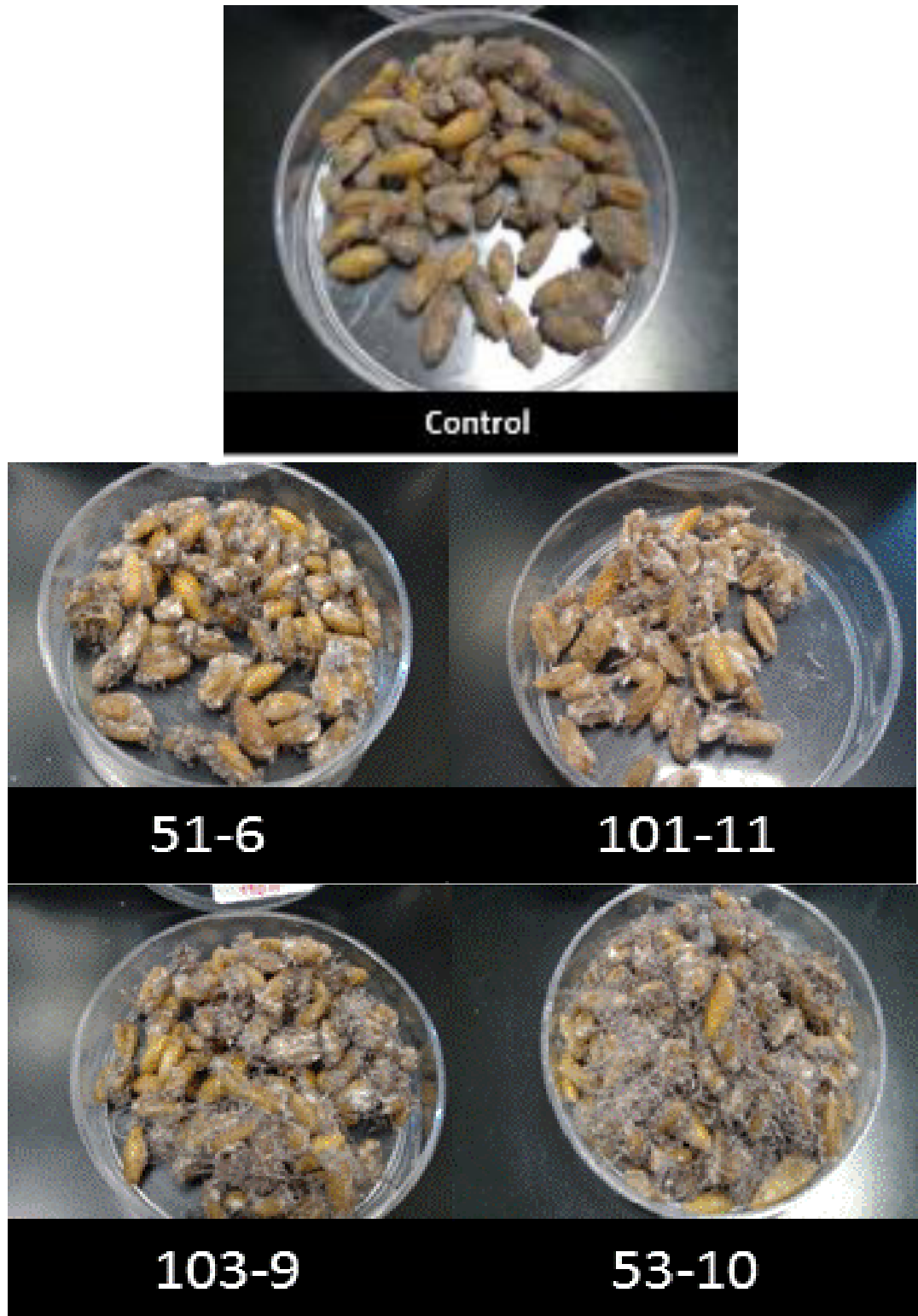


Figura 37. Formación de conidios de cepas mutantes y silvestre (control) de *H. citriformis* INIFAP-Hir-2 sobre el sustrato avena a los 21 días de incubación

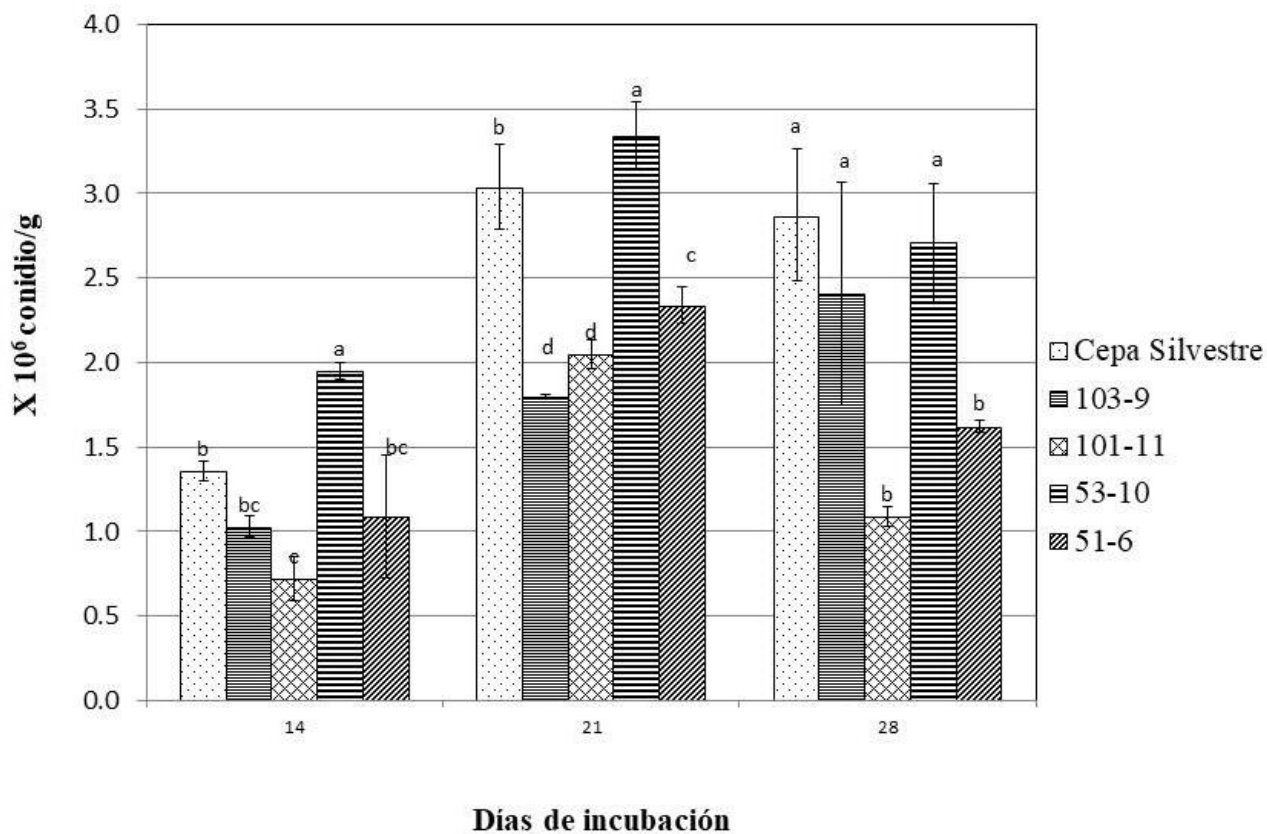


Figura 38 Producción de conidios (5 repeticiones) de las cepas mutantes y silvestre de *Hirsutella citriformis* INIFAP-Hir-2 en sustrato avena a 25°C de incubación. Letras distintas indican diferencias significativas según Tukey (P<0.05).

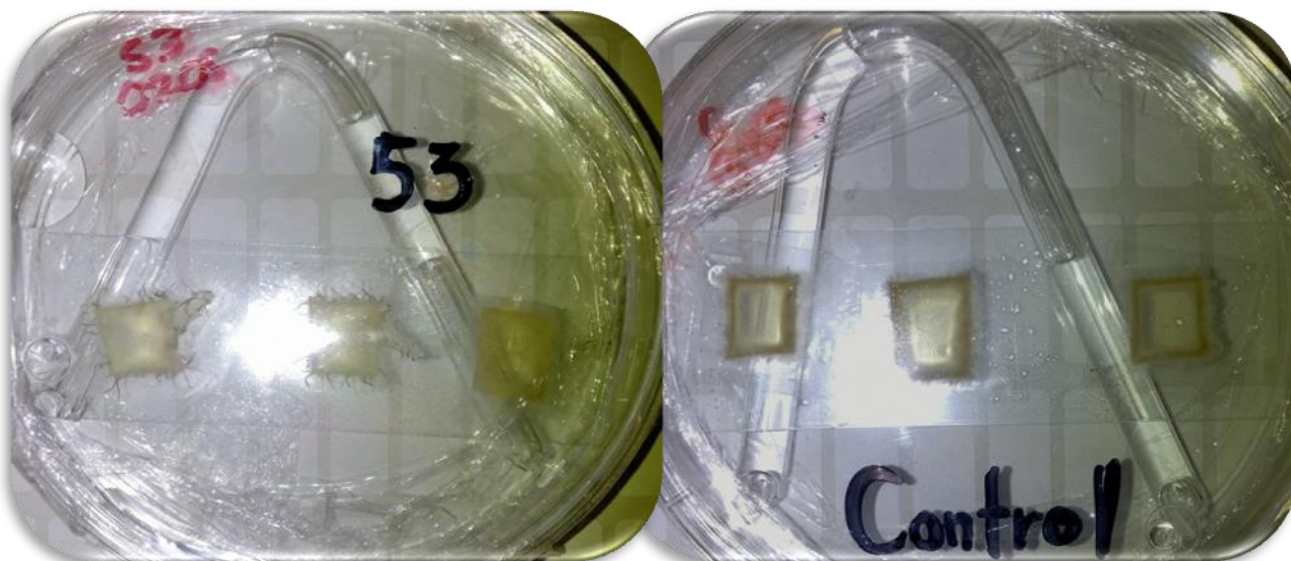


Figura 39. Microcultivo de cepas mutante 53-10 y silvestre (control) de *H. citriformis* INIFAP-Hir-2 sobre PDAY 1% a los 15 días de incubación

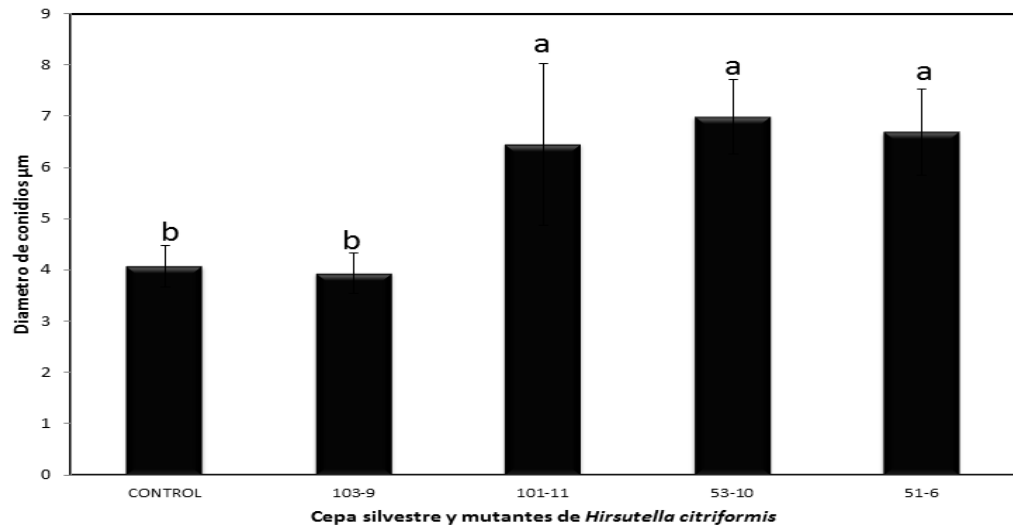


Figura 40. Promedio del diámetro de los conidios (3 repeticiones) de las cepas mutantes y silvestre de *H. citriformis* INIFAP-Hir-2. Valores con letras distintas indican diferencias significativas según Tukey ($P < 0.05$)



Figura 42. Cepa mutante 53-10 de *Hirsutella citriformis* **A.** Exudados sobre sinemas. **B.** Desarrollo de sinemas. Visto en estereoscopio 10X

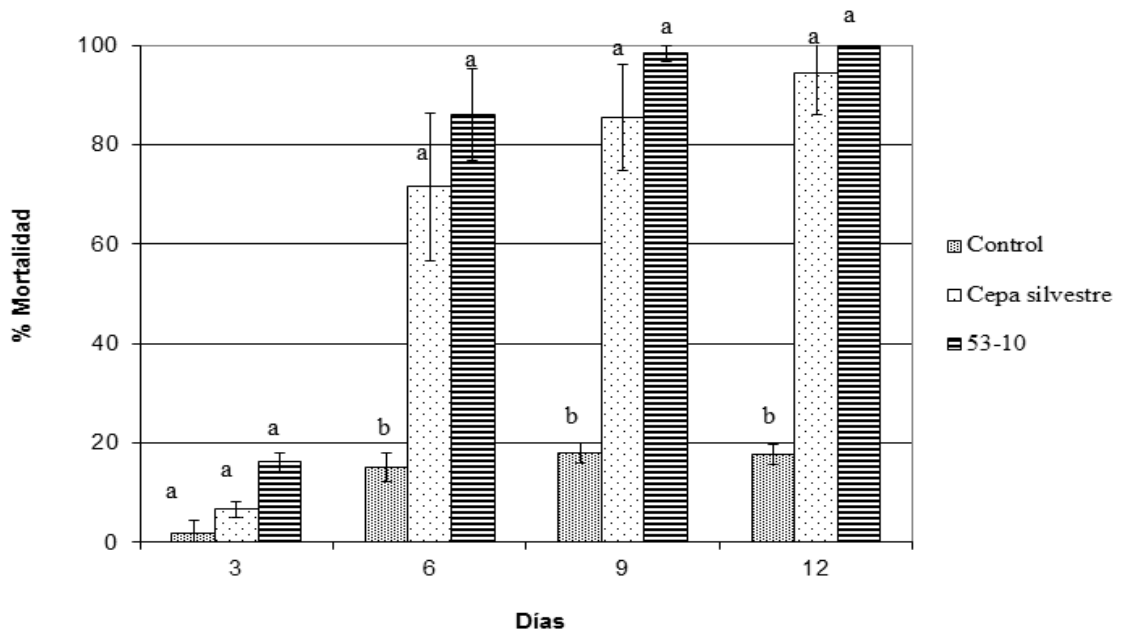


Figura 43. Mortalidad promedio de *Diaphorina citri* (tres repeticiones) causada por conidios de cepa silvestre y mutante (53-10) de *H. citrifomis* INIFAP-Hir-2, incubados a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, HR $76\pm 4\%$ y 16:8 horas de luz: oscuridad. Valores con letras distintas indican diferencias significativas según Tukey ($P < 0.05$).

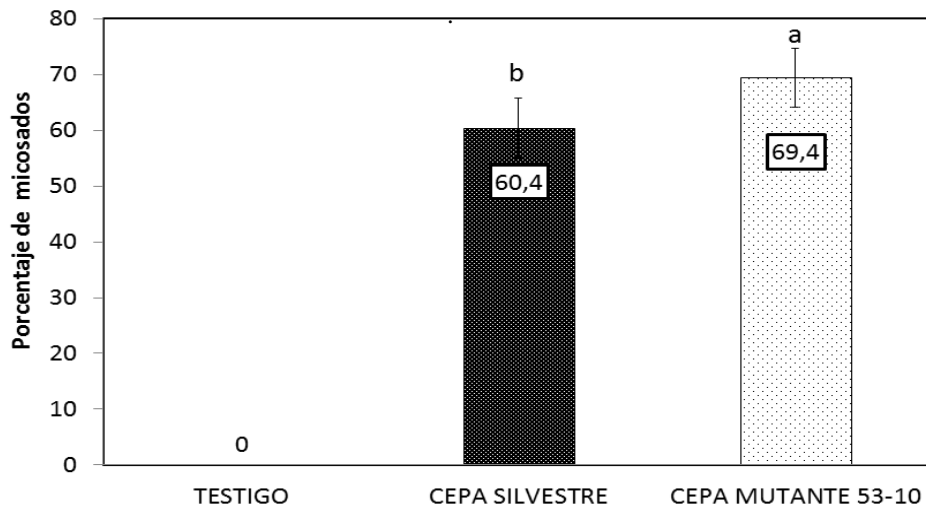


Figura 44. Porcentaje de adultos de *Diaphorina citri* micosados por la cepa silvestre de *Hirsutella citrifomis* INIFAP-Hir-2 y mutante 53-10 a los 12 días de evaluación. Valores con letras distintas indican diferencias significativas según Tukey ($P < 0.05$).



Figura 45. Crecimiento de *Hirsutella citriformis* sobre adultos de *Diaphorina citri* inoculados por contacto. **A.** *D. citri* micosado por cepa silvestre **B.** Desarrollo posterior a 9 días. **C y D.** Desarrollo de cepa mutante 53-10.

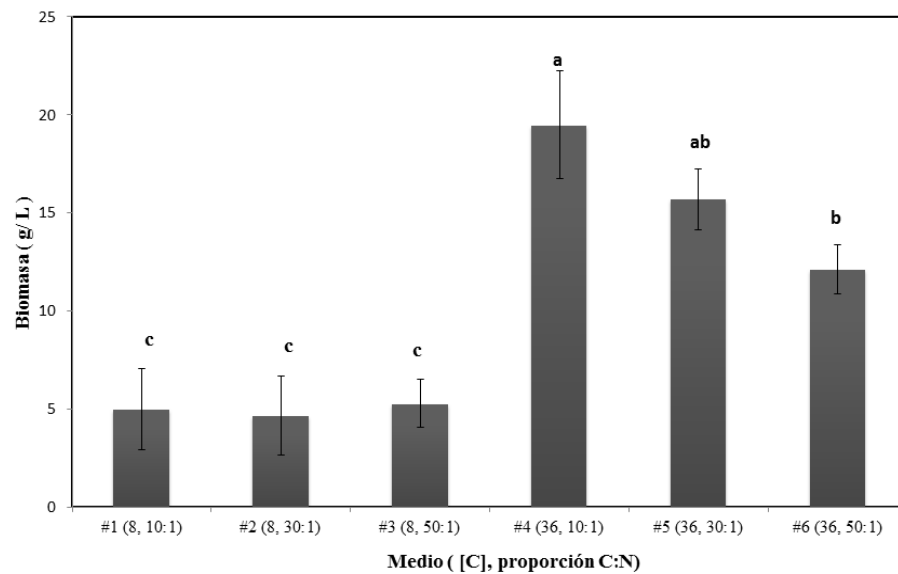
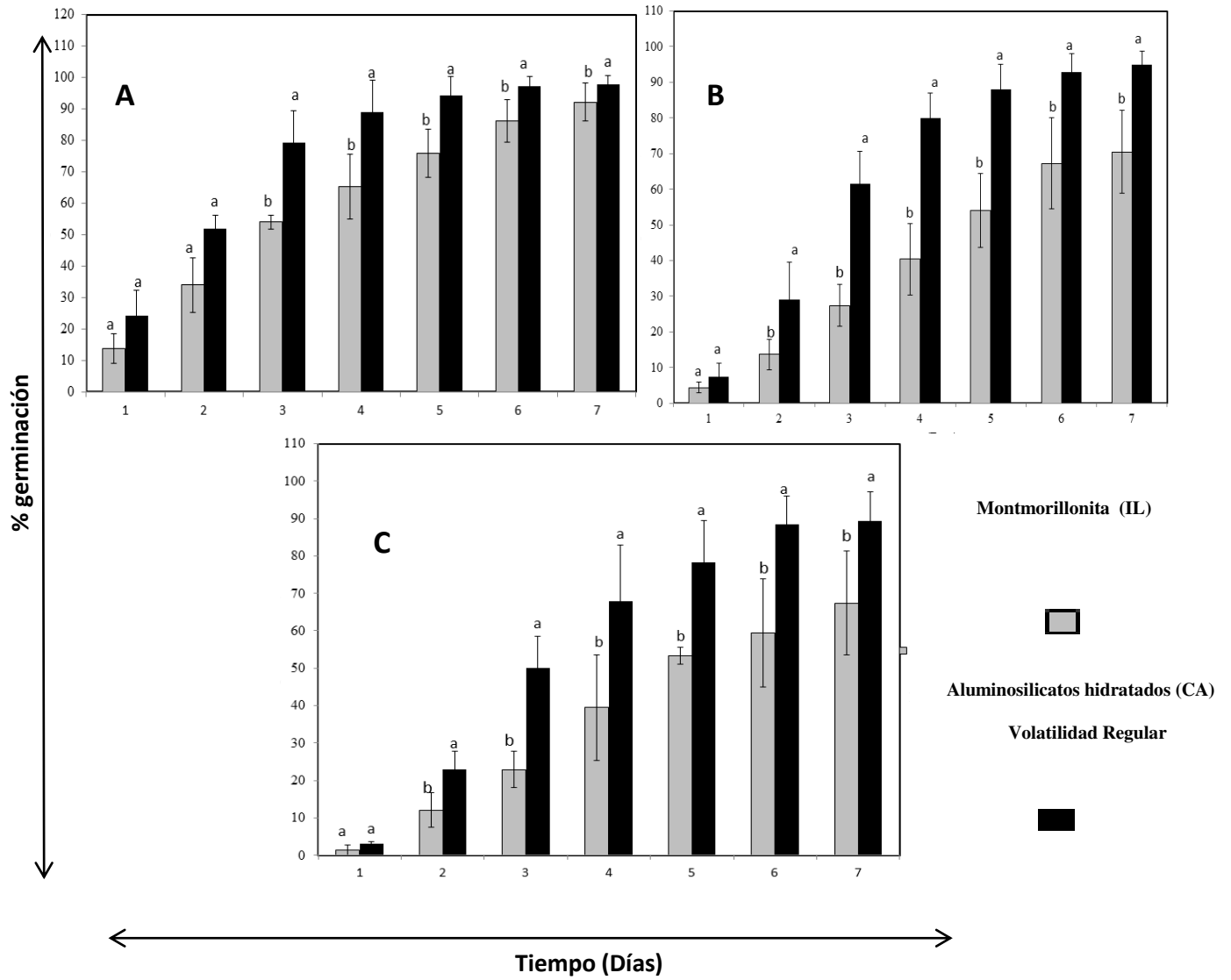


Figura 46. Producción de biomasa de la cepa *H. citriformis* INIFAP-Hir-2. Los cultivos crecieron durante 7 días en un medio de sales basales adicionado con vitaminas y trazas de metales conteniendo glucosa como fuente de carbono y caseína hidrolizada como fuente de nitrógeno. Valores con letras distintas indican diferencias significativas según Tukey ($P < 0.05$).



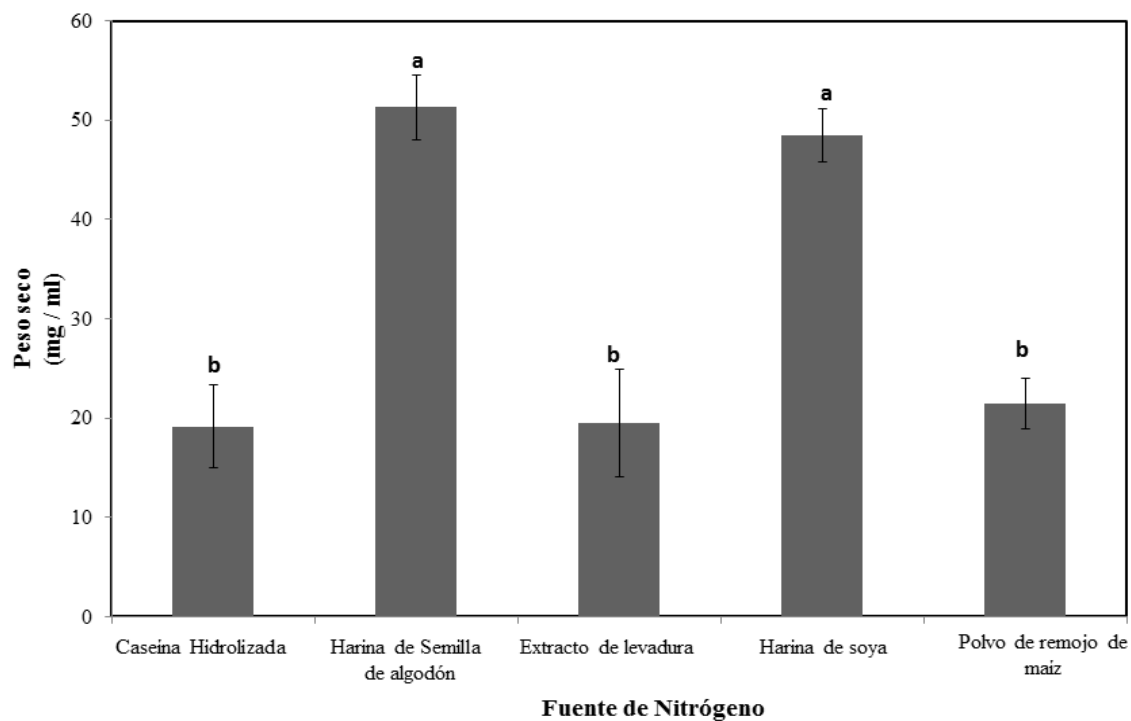


Figura 48. Producción promedio de micelio (5 repeticiones) de la cepa *H. citrifomis* INIFAP-Hir-2 usando diferentes fuentes de nitrógeno posterior a 7 días de crecimiento a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$). Letras diferentes indican diferencia significativa entre los medios. Tukey ($P < 0.05$).

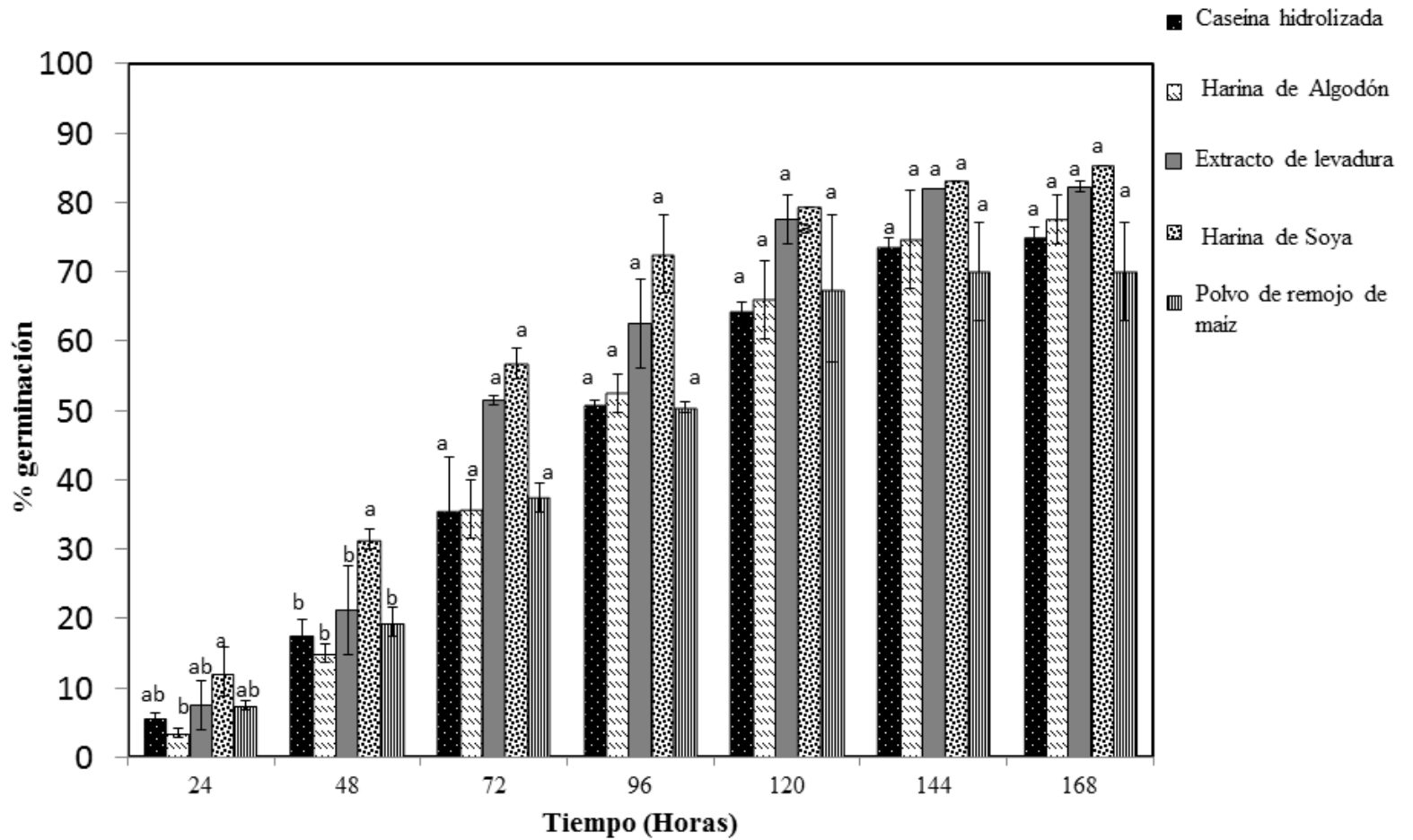


Figura 49. Viabilidad de cultivos de *Hirsutella citriformis* secados por aire (<5% humedad) sobre la arcilla Attapulgita (GA) -325. Los cultivos crecieron durante 7 días a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) y agitación a 300 rpm en un medio de sales basales, conteniendo glucosa como fuente de carbono (36g/L) y diferentes fuentes de nitrógeno, relación de C:N 10:1. Letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre los medios dentro de cada tiempo Tukey ($P<0.05$).

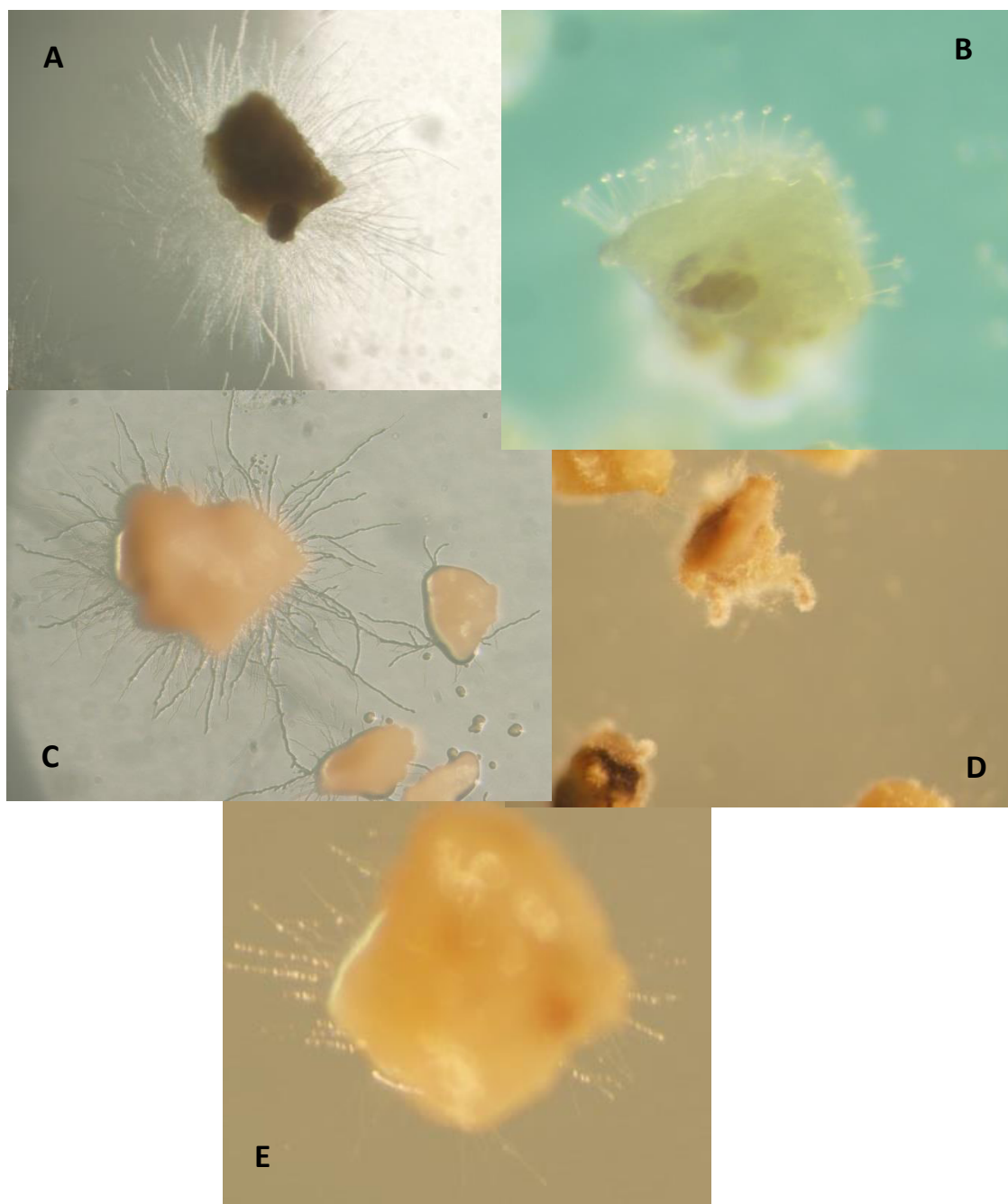


Figura 50. Germinación micelio de *H. citriformis* INIFAP-Hir 2 sobre la arcilla Attapulgita (GA) -325 Volatilidad regular. **A** Caseína hidrolizada, **B** Harina de Algodón, **C**. Extracto de levadura, **D** Harina de Soya, **E**. Polvo de remojo de maíz

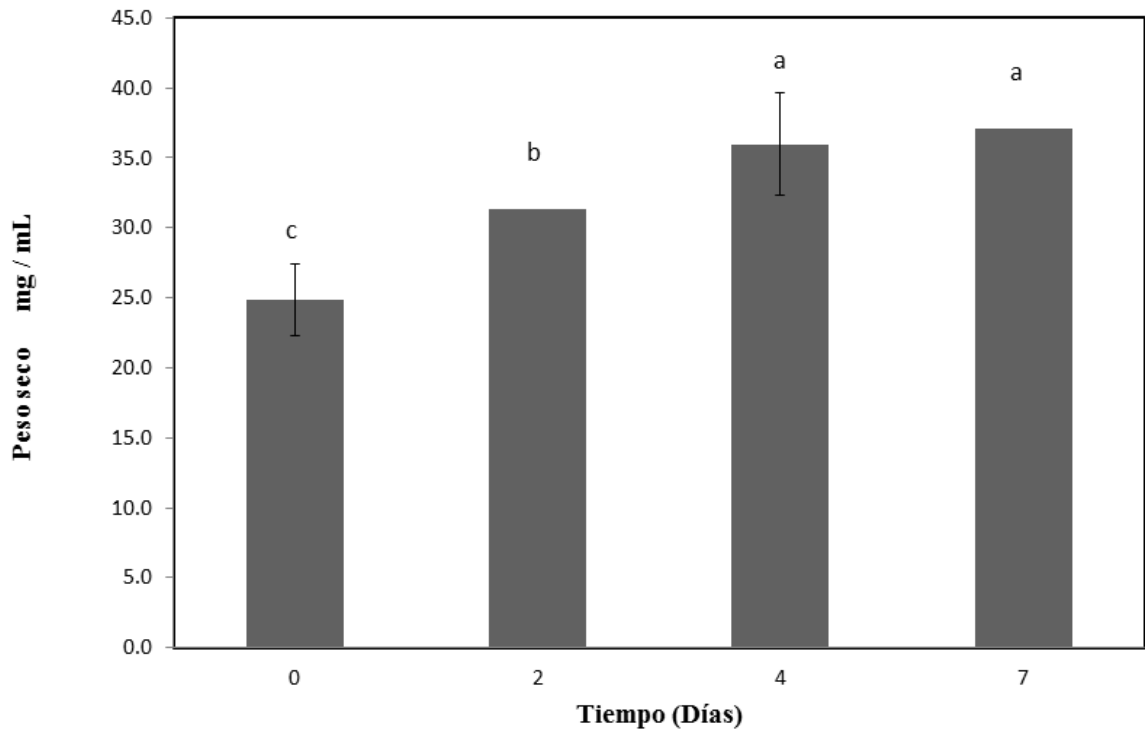


Figura 51. Producción de micelio de *H. citriformis* INIFAP- Hir-2 en un medio de sales basales conteniendo 36 g de glucosa como fuente de carbón y harina de soya como fuente de nitrógeno proporción de C:N de 10:1. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey (0.05)

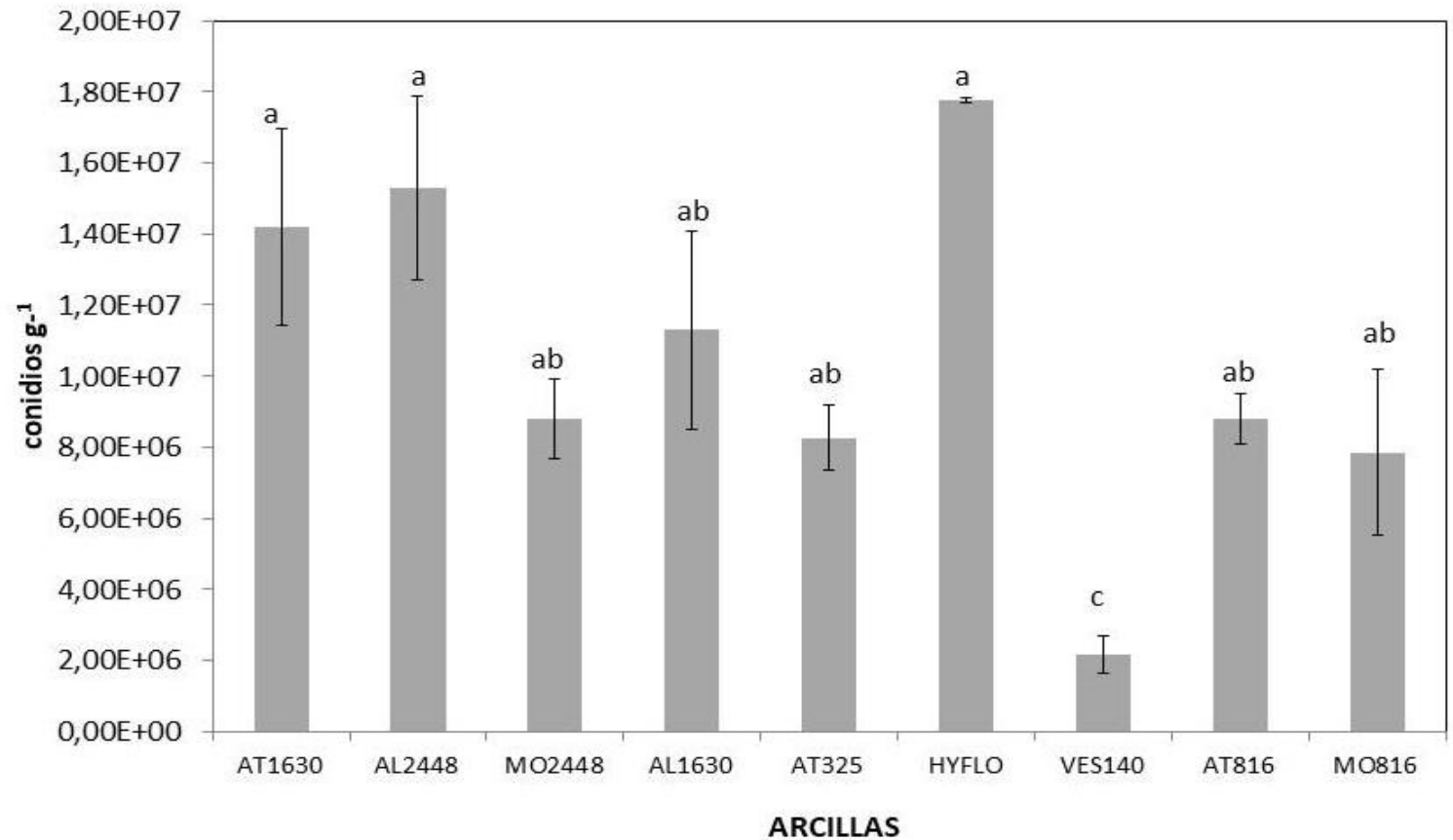


Figura 52. Comparación de producción de conidios en diferentes arcillas a los 12 días postinoculación de la cepa INIFAP-Hir- 2, inoculadas con cultivo liquido en un medio de sales basales adicionado con vitaminas y trazas de metales y 36 g de glucosa como fuente de carbón y harina de soya como fuente de nitrógeno proporción de C:N de 10:1. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey (0.05).

13. TABLAS

Tabla 1. Características de los estadios del livido asiático de los cítricos

ESTADIO	TAMAÑO	CARACTERISTICAS
Huevo	0.3mm de largo y 0.14mm de ancho	Amarillo claro, con la madurez se tornan naranja brillante. Periodo de desarrollo 4 días. Una vez que eclosionan surgen las ninfas.
1er instar	0.3 mm de largo y 0.17mm de ancho	Color ligero rosado. Se observa un par de ojos
2do instar	0.45mm de largo y 0.25mm de ancho	Se observa un par de alas rudimentarias
3er instar	0.74mm de largo y 0.43mm de ancho	Par de alas desarrolladas y segmentación de las antenas
4to instar	1.01mm de longitud y 0.70mm de ancho	Completo el desarrollo de alas y antenas.
5to instar	1.60 mm de longitud y 1.02 mm de ancho	Se desarrollan las alas y las antenas

Tabla 2. Agentes de Control Biológico utilizados contra el vector *Diaphorina citri*

Enemigo natural	Tipo	Estadio	Familia/Orden	Referencias
<i>Beauveria bassiana</i>	HE		Hypocreales: Clavicipitaceae	Rivero-Aragón and Grillo-Ravelo 2000; Gandarilla-Pacheco et al. 2013; Zhang et al. 2013.
<i>Chilocorus cacti</i>	Depredador	Ninfas	Coleoptera: Coccinellidae	Rodríguez-Palomera et al. 2012
<i>Chilocorus nigrita</i>	Depredador	Adulto ninfas	Coleoptera: Coccinellidae	Husain and Nath 1927
<i>Cycloneda sanguínea</i>	Depredador	Ninfas	Coleoptera: coccinellidae	Rodríguez-Palomera et al. 2012
<i>Diaphorencyrtus aligarhensis</i>	Parasitoide	Ninfas	Hymenoptera: Encyrtidae	Viraktamath & Bhumannavar(2002)
<i>Entomophthora</i>	HE		Entomophthorales: Entomophthoraceae	Guizar-Guzman & Sánchez-Peña 2013
<i>Hirsutella citrififormis</i>	HE	Adulto ninfas	Hypocreales: Ophiocordycipitaceae	Rivero-Aragón and Grillo-Ravelo 2000; Subandiyah et al. 2000; Meyer et al. 2007; Casique Valdes et al. 2011; Hall et al. 2012; Pérez-González et al. 2015
<i>Cephalosporium lecanii</i>	HE	Adulto Ninfas	Hypocreales: clavicipitaceae	Rivero-Aragón and Grillo-Ravelo 2000; Xie et al. 1988
<i>Olla v-nigrum</i>	Depredador	Ninfas	Coleoptera: coccinellidae	Rodríguez-Palomera et al. 2012
<i>Isaria fumosorosea</i>	HE	Adulto Ninfas	Eurotiales: Trichocomaceae	Meyer et al. 2008; Avery et al. 2009; Hoy et al. 2010; Hunter et al. 2011; Lezama-Gutiérrez et al. 2012
<i>Tamarixia radiata</i>	Parasitoide	Ninfas	Hymenoptera: Eulophidae	McFarland and Hoy 2001

Tabla 3. Composición porcentual promedio de cereales comunes sobre una base de peso seco (Zabriskie 1980)

Cereal	celulosa	Almidón y carbohidratos	Lípidos	Otras fuentes no nitrogenadas	Proteína	Ceniza
Cebada	5.7	71	2.5	4.0	11.8	3.1
Trigo	2.9	76	2.0	2.8	14.5	2.2
Centeno	2.4	74	2.0	5.8	13.5	2.4
Avena	12.4	61	6.1	2.4	13.4	3.5
Maíz	4.2	70	5.8	7.6	11.6	1.2
Arroz.	2.3	81	0.5	--	9.0	0.4

Tabla 4. Concentración carbón (g l^{-1}) y proporción carbón-nitrógeno (C:N) en los medios líquidos usados para evaluar el crecimiento y formación de propágulos de la cepa *Hirsutella citrifomis* INIFAP-Hir-2.

Medio liquido	Carbón (g l^{-1})	C:N	Glucosa (g l^{-1})	Hidrolizado de Caseína (g l^{-1})
1	8	10:1	10	10
2	8	30:1	16.6	3.4
3	8	50:1	18	2.0
4	36	10:1	45	45
5	36	30:1	75	15
6	36	50:1	81	9

Tabla 5. Arcillas utilizadas en la prueba de germinación

Arcilla 1	Arcilla 2
SILICATO DE MAGNESIO HIDRATADO (MATERIAL VOLATILIDAD BAJA) ILLINOIS GRANULOMETRIA 24/48	ALUMINISILICATO HIDRATADO (MATERIAL DE VOLATILIDAD REGULAR) CALIFORNIA GRANULOMETRIA 24/48

Tabla 6. Ingredientes utilizados como fuente de nitrógeno en los medios para producción de biomasa.

Número de Medio	Fuente de Nitrógeno	Concentración
1	Casaminoácidos	45g/ L
2	Harina de Algodón (Pharmamedia)	45g/L
3	Extracto de Levadura	45g/L
4	Harina de Soya	45g/L
5	Polvo de remojo de maíz	45g/L
6	Sulfato de Amonio	18g/L

TABLA 7. Arcillas utilizadas en la producción de conidios de *H. citriformis* INIFAP- Hir-2.

Arcilla	Granulometría	Volatilidad	Descripción
<i>Attapulgita (GA)</i>	16/30	REGULAR	Es un aluminio-filosilicato de magnesio, hidroxilado e hidratado, que suele llevar como impurezas: hierro y potasio
Aluminosilicatos hidratados (CA)	24/48	REGULAR	Se componen fundamentalmente de aluminio y sílice
Montmorillonita (IL)	24/48	BAJA	Es un mineral del grupo de los silicatos, se compone por una capa central que contiene Aluminio y magnesio.
Aluminosilicatos hidratados (CA)	16/30	REGULAR	Se componen fundamentalmente de aluminio y Sílice.
<i>Attapulgita (GA)</i>	-325	REGULAR	Es un aluminio-filosilicato de magnesio, hidroxilado e hidratado, que suele llevar como Impurezas: hierro y potasio.
HYFLO			Tierra de diatomeas es una roca sedimentaria silíceo formada por micro-fósiles de diatomeas que son algas marinas unicelulares que secretan un esqueleto silíceo llamado frústula.
Verge Montmorillonita (MS)	S-140	SGN	Míneral del grupo de los silicatos, se compone por una capa central que contiene aluminio y magnesio
<i>Attapulgita (GA)</i>	8/16	BAJA	Es un aluminio-filosilicato de magnesio, hidroxilado e hidratado, que suele llevar como Impurezas: hierro y potasio.
Montmorillonita (MS)	8/16	BAJA	Es un mineral del grupo de los silicatos, se compone por una capa central que contiene Aluminio y magnesio.

Tabla 8. Producción de conidios de cepas silvestres de *H. citrifomis* en medio PDA más 0.5% extracto de levadura a los 35 días de incubación a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Letras diferentes indican diferencia significativa entre las cepas (Tukey, $p < 0.01$).

INIFAP-Hir-4	2.10×10^5 e
INIFAP-Hir-6	2.70×10^5 d
IB-Hir-1	2.50×10^5 d
INIFAP-Hir-2	4.90×10^5 a
IB-Hir-2	3.50×10^5 c
INIFAP-Hir-1	3.90×10^5 b
INIFAP-Hir-7	2.43×10^5 e

Tabla 9. Número de colonias mutantes de *H. citrifomis* INIFAP-Hir-2 obtenidas después del tratamiento con metanosulfonato de etilo.

(5 000 $\mu\text{g} / \text{mL}$)		(10 000 $\mu\text{g} / \text{mL}$)	
60 minutos	180 minutos	60 minutos	180 minutos
11	12	23	17

Tabla 10. Porcentaje de germinación de conidios producidos por cepa silvestre y mutantes de *H. citriformis* INIFAP-Hir-2 crecidas en medio PDAY a $25\pm 2^\circ\text{C}$. Letras diferentes dentro de cada columna indican diferencia significativa determinada a través de ANOVA y análisis de Tukey nivel 0.05

	24 h	48 h
Cepa silvestre	72 ab	94 a
103-9	70 b	88a
101-11	37 c	74b
53-10	80 a	91a
51-6	36 c	58b

Tabla 11. Comparación de viabilidad (% germinación) de la cepa INIFAP- Hir – 2 en diferentes arcillas, inoculadas con cultivo liquido en un medio de sales basales adicionado con vitaminas y adicionado con vitaminas y trazas de metales y 36 g de glucosa como fuente de carbón y harina de soya como fuente de nitrógeno proporción de C:N de 10:1.

Código de Arcilla	% Germinación					
	HORAS					
	24	48	72	96	120	144
AT1630	27b,c	40b	71b	79a,b	86a	96a,b
AL2448	71a	97a	100 ^a	100a	100a	100 ^a
MO2448	52a,b	91a	99 ^a	100a	100a	100 ^a
AL1630	74a	98a	99 ^a	100a	100a	100a
AT325	1c	8c	35c	44c	61b	75c
HYFLO	15b,c	31bc	74b	83a,b	90a	94a,b
VES140	1c	33bc	63b	73b	85a	88b
AT816	89a	100a	100a	100a	100a	100a
MO816	51a,b	100a	100a	100a	100a	100a

Los datos son medias \pm DE analizadas mediante ANOVA de una vía seguida por la prueba de Tukey (0.05), utilizando software de Minitab 17 (2010). Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes a $P < 0,05$, dentro de cada columna.

Tabla 12. Nomenclatura de Arcillas

Código	Arcilla	Granulometría	Volatilidad
AT1630	Attapulgita (GA)	16/30	REGULAR
AL2448	Aluminosilicatos hidratados (CA)	24/48	REGULAR
MO2448	Montmorillonita (IL)	24/48	BAJA
AL1630	Aluminosilicatos hidratados (CA)	16/30	REGULAR
AT325	Attapulgita (GA)	-325	REGULAR
HYFLO	HYFLO	-	-
VES140	Verge Montmorillonita (MS)	S-140	SGN
AT816	Attapulgita (GA)	8/16	BAJA
MO816	Montmorillonita (MS)	8/16	BAJA

14. RESUMEN BIBLIOGRAFICO

L.C.A Georgina Cruz Juárez

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

Tesis: AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE *Hirsutella citriformis* INDUCIDAS POR EL AGENTE QUÍMICO: METANOSULFONATO DE ETILO (EMS)

Campo de Estudio: Biotecnología

Datos Personales: Nacida en el Estado de México el 04 de Marzo de 1982, hija de Jorge Cruz Martinez y Ma. Rosalia Juárez Ventura.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grado Obtenido de Licenciatura en Ciencia de los Alimentos 2001-2005.

Participación en el proyecto: Producción de formulaciones usando propagulos de *Hirustella citriformis* 15 de Junio de 2015 a 15 de Septiembre de 2015 en **U.S. Department of Agriculture, Peoria Illinois.**

Experiencia Profesional: Participación en Proyecto de investigación sobre los niveles de pectina en el agave relacionadas con la concentracion de metanol en el tequila en José Cuervo (2006). Analista fisicoquímico, Microbiologico y Aseguramiento de Calidad en Pepsico Division Foods (2010). 6 años en Calidad alimentaria.