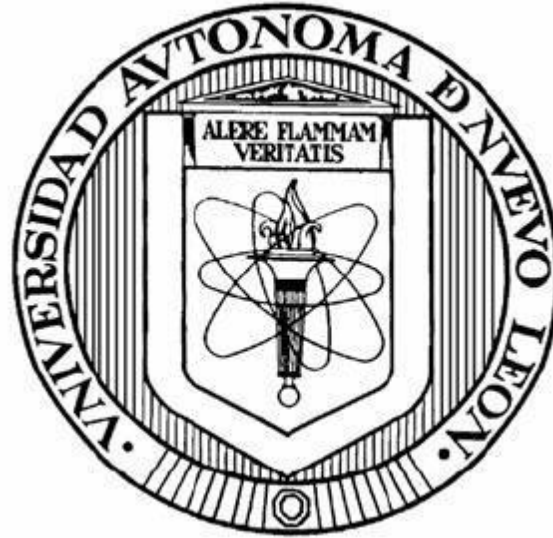


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



FORMULACIÓN Y VIDA DE ANAQUEL DE CONIDIOS DE *Hirsutella*  
*citriformis* Speare PARA EL BIOCONTROL DE *Diaphorina citri* Kuwayama Y  
*Bactericera cockerelli* Sulc.

POR

ROSA ÁNGELA FLORES VILLARREAL

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

2022

**FORMULACIÓN Y VIDA DE ANAQUEL DE CONIDIOS DE *Hirsutella citriformis* Speare PARA EL BIOCONTROL DE *Diaphorina citri* Kuwayama Y *Bactericera cockerelli* Sulc.**

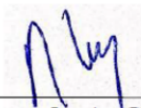
**Comité de Tesis**



---

**Dra. Patricia Tamez Guerra**

Presidente



---

**Dr. Ricardo A. Gómez Flores**

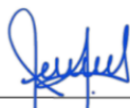
Secretario



---

**Dr. Alonso Alberto Orozco Flores**

Vocal 1



---

**Dra. María Julissa Ek Ramos**

Vocal 2



---

**Dr. José Alberto Valdez Lira**

Vocal 3



---

**Dra. Katiushka Arevalo Niño**

Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO

**FORMULACIÓN Y VIDA DE ANAQUEL DE CONIDIOS DE *Hirsutella*  
*citriformis* Speare PARA EL BIOCONTROL DE *Diaphorina citri* Kuwayama Y  
*Bactericera cockerelli* Sulc.**

**Dirección de Tesis**



---

**Dra. Patricia Tamez Guerra**

Director



---

**Dra. Orquídea Pérez González**

Director externo

**DERECHOS RESERVADOS©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

**Financiamiento.** CONACYT-ciencia básica 2018, Clave A1-S-1081042

## AGRADECIMIENTOS

A mis asesoras, **Dra. Patricia Tamez Guerra** y la **Dra. Orquídea Pérez González**, por su apoyo constante, sus enseñanzas, consejos y por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, la confianza brindada hacia mi persona y proporcionarme espacio para la realización de este proyecto.

A mi comité de tesis por su colaboración, apoyo y consejo que me brindaron a lo largo de este proyecto, al **Dr. Ricardo Gómez Flores**, **Dra. Julissa Ek-Ramos** y al **Dr. José Alberto Valadez Lira** y en especial al **Dr. Alonso Orozco Flores** por brindarme su apoyo, compartir sus conocimientos y consejo durante todo el transcurso del trabajo de tesis, desde su inicio hasta el fin.

A mis compañeros y amigos de Laboratorio, **Servando, Ricardo, Maribel y Angello**, así como a **Norita**, Doña **Rosy** y **Queta**.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo brindado para el desarrollo de mis estudios de Maestría.

A la **Universidad Autónoma de Nuevo León** por brindarme un espacio para mi desarrollo profesional.

A la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla**, por darme la oportunidad de realizar este proyecto en el departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

A mis padres, **Irma** y a mi **hermana** por todo el apoyo y ánimo durante esta etapa.

A mis queridas amigas de licenciatura **Fernanda, Ale, Yanelli** y **Paola** que aun en la distancia y pese al tiempo, siempre estuvieron ahí, las quiero mucho y gracias por todas las aventuras.

A mi querida amiga **Nohemí** que, pese al tiempo, la pandemia y las dificultades tengo la dicha de haberla conocido, conservar la amistad forjada y compartir tiempo con ella.

## DEDICATORIA

A mi madre, Irma Villarreal, por haber estado disponible las 24 horas para mí, por haberme dado todo sin esperar nada a cambio, por dejar de dormir cuando enfermaba, por llorar cuando yo sufría y por reír cuando triunfaba.

Gracias.

Vivir no es sólo existir,  
sino existir y crear,  
saber gozar y sufrir  
y no dormir sin soñar.  
Descansar, es empezar a morir.

-Gregorio Marañón

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	5
DEDICATORIA .....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	XI
LUGAR DE TRABAJO.....	XII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Formulación de agentes de control biológico.....	3
2.2 Hongos entomopatógenos y su mecanismo de acción .....	4
2.3 Generalidades de <i>Hirsutella citriformis</i> .....	5
2.4 <i>Hirsutella citriformis</i> como agente de biocontrol .....	7
2.5 Producción de exopolisacáridos en <i>Hirsutella</i> spp. ....	9
2.6 <i>Diaphorina citri</i> como insecto plaga.....	10
2.7 Importancia de la citricultura en México .....	10
2.8 <i>Bactericera cockerelli</i> como insecto plaga.....	10
2.9 Importancia de <i>B. cockerelli</i> en México .....	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	12
4. HIPÓTESIS.....	13
5. OBJETIVOS.....	14
5.1 Objetivo general .....	14
5.2 Objetivos específicos.....	14
6. MATERIAL Y MÉTODO .....	15
6.1 Activación de cepas. ....	15
6.2 Producción de goma de <i>H. citriformis</i> .....	15
6.3 Cultivo bifásico de <i>H. citriformis</i> (producción de conidios).....	15
6.4 Concentración de conidios.....	16

6.5 Viabilidad inicial de conidios. ....	16
6.6 Efecto de los diferentes componentes del formulado en la viabilidad de conidios de <i>H. citriformis</i> . ....	17
6.7 Preparación del formulado. ....	17
6.8 Vida de anaquel de los conidios. ....	18
6.9 Efecto del pH en la estabilidad de los formulados. ....	18
6.10 Prueba de pureza. ....	19
6.11 Análisis estadísticos. ....	19
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
7.1 Efecto de los diferentes componentes del formulado en la viabilidad de conidios de <i>H. citriformis</i> . ....	20
7.2 Vida de anaquel de los formulados de <i>H. citriformis</i> almacenados a dos temperaturas diferentes ( $25 \pm 2$ °C y $4 \pm 1$ °C). ....	22
7.3 Estabilidad de los formulados con base en su pH y pureza. ....	30
8. CONCLUSIONES. ....	38
PERSPECTIVAS .....	39
BIBLIOGRAFÍA. ....	40
RESUMEN BIOGRÁFICO .....	48



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	<b>Componentes de las diferentes formulaciones.....</b>	<b>18</b>
<b>Tabla 2.</b>	<b>Pureza de los formulados con <i>H. citriformis</i> OP-Hir-3 almacenados a 25 °C.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabla 3.</b>	<b>Pureza de los formulados con <i>H. citriformis</i> OP-Hir-3 almacenados a 4 °C.....</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 4.</b>	<b>Pureza de los formulados con <i>H. citriformis</i> OP-Hir-10 almacenados a 25 °C.....</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 5.</b>	<b>Pureza de los formulados con <i>H. citriformis</i> OP-Hir-10 almacenados a 4 °C.....</b>	<b>37</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama del desarrollo de un hongo entomopatígeno.....	6
Figura 2.	Crecimiento de <i>Hirsutella citriformis</i> en medios micológicos.....	7
Figura 3.	Crecimiento de <i>H. citriformis</i> en un adulto momificado de <i>D. citri</i> .....	8
Figura 4.	Porcentaje de germinación de conidios de <i>H. citriformis</i> en presencia de los componentes del formulado.....	20
Figura 5.	Germinación de conidios de <i>H. citriformis</i> OP-Hir-3 almacenados a 25 °C.....	23
Figura 6.	Germinación de conidios de <i>H. citriformis</i> OP-Hir-3 almacenados a 4 °C.....	24
Figura 7.	Germinación de conidios de <i>H. citriformis</i> OP-Hir-10 almacenados a 25 °C.....	26
Figura 8.	Germinación de conidios de <i>H. citriformis</i> OP-Hir-10 almacenados a 4 °C.....	27
Figura 9.	Germinación de conidios de <i>H. citriformis</i> OP-Hir-3 y OP-Hir-3 almacenados a 90 días.....	29
Figura 10.	pH de los formulados con conidios de <i>H. citriformis</i> OP-Hir-3 almacenados a 25 °C.....	31
Figura 11.	pH de los formulados con conidios de <i>H. citriformis</i> OP-Hir-3 almacenados a 4 °C.....	32
Figura 12.	pH de los formulados con conidios de <i>H. citriformis</i> OP-Hir-10 almacenados a 25 °C.....	33
Figura 13.	pH de los formulados con conidios de <i>H. citriformis</i> OP-Hir-10 almacenados a 4 °C.....	34

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

rpm	Revoluciones por minuto
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
lb	Libra
<i>P</i>	Probabilidad
PDA	Papa dextrosa agar
pH	Potencial de hidrogeniones
HEP	Hongos entomopatógenos
HLB	Enfermedad de Huanglongbing
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
kDa	KiloDalton
EPS	Exopolisacárido
DE	Desviación estándar

## **LUGAR DE TRABAJO**

El desarrollo experimental del presente trabajo se elaboró en la unidad de Formulación de Biológicos de Laboratorio de Inmunología y Virología, del Departamento de Microbiología e Inmunología, en la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Patricia Tamez Guerra.

## RESUMEN

El control biológico es un método para restringir los efectos dañinos de plagas utilizando otros organismos útiles. Es utilizado principalmente para controlar plagas en cultivos agrícolas. Una alternativa a esta problemática es el uso de hongos entomopatógenos, como *Hirsutella citriformis*, que se han aplicado como agentes de biocontrol por su potencial de infectar insectos Hemípteros. La aplicación de estos agentes consiste principalmente en forma de conidios, que a menudo se combinan con otros materiales para facilitar el modo de aplicación y proteger al conidio, además de su vida de anaquel. El objetivo de este estudio fue implementar estrategias para elaborar formulados a base de conidios de *H. citriformis*. Para lograrlo, se seleccionaron concentraciones de goma de *Acacia* sp. y de *H. citriformis*, así como la temperatura adecuada de almacenado para mantener la viabilidad y virulencia en diferentes formulados. Los resultados, de los distintos tratamientos indicaron que después de 90 días de almacenamiento, el porcentaje de germinación se observó superior al 70% de viabilidad que, en comparación con el testigo, los formulados presentan mayor estabilidad significativa. Al analizar los valores del pH, los tratamientos permanecieron estables después de 90 días. Los resultados indican una pureza del 100% al día de la toma inicial (día 0), la cual se mantuvo en todos los tratamientos transcurridos 90 días.

## ABSTRACT

Biological control is a tool for reducing harmful pests' effects by using other useful organisms. It is used mainly to control pests in agricultural crops. An alternative for this is entomopathogenic fungi application, such as *Hirsutella citriformis*, due to their potential to infect Hemipteran insects. The application of these agents mainly consists of conidia, which are often combined with other materials to facilitate the mode of application and to protect them against harmful environmental conditions, as well as for shelf life. The aim of this study was to implement strategies for the elaboration of formulations based on *H. citriformis* conidia. To achieve this, *Acacia* sp. and *H. citirformis* gum were selected, as well as the appropriate storage temperature to maintain their viability and virulence in different formulations. Results indicated that after 90 days of storage, germination percentage was above 70% of viability as compared with that of the control and formulations showed significant stability. Analyzing pH values, treatments remained stable after 90 days. Results evidenced 100% purity on the day of the initial intake (day 0), which was maintained in all treatments after 90 days.

# 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, los plaguicidas químicos representan alrededor del 95% del mercado mundial de plaguicidas y previenen una pérdida estimada de cultivos del 50%. Estas tasas de pérdida no han disminuido durante las últimas décadas. Además, hallazgos e informes de posibles efectos indeseables de los plaguicidas químicos en los recursos naturales, la salud animal y humana están impulsando la búsqueda de alternativas a los plaguicidas químicos (De la Cruz *et al.* 2019; Silveira-Gramont *et al.* 2018).

El control biológico es un método para restringir los efectos dañinos de plagas utilizando otros organismos útiles, por ejemplo, insectos, plantas o microorganismos que inhiben a los organismos nocivos. Actualmente, el control biológico es utilizado principalmente para controlar plagas en cultivos agrícolas (Flint y Dreistadt, 1998; Rusch *et al.* 2010). Entre las estrategias de control biológico en desarrollo, una de las más importantes son los bioplaguicidas, es decir, las formulaciones basadas en agentes de control biológico como bacterias, hongos o virus. El uso frecuente de hongos entomopatógenos en los bioplaguicidas refleja su papel en la naturaleza como reguladores de las poblaciones de pulgones, garrapatas y otros insectos, y otras plagas que afectan a plantas y animales, en donde actualmente, este (control biológico) es utilizado principalmente para el control de plagas en cultivos agrícolas (Khan *et al.* 2012).

Algunos hongos entomopatógenos como *Hirsutella citriformis* Speare son utilizados como agentes de biocontrol por su capacidad de infectar insectos Hemípteros. *Hirsutella citriformis* ha sido utilizado en el control de *Diaphorina citri* Kuwayama y *Bactericera cockerelli* Sulc al mostrar patogenicidad en ambos insectos (Casique *et al.* 2011; Pérez-González *et al.* 2015). Tanto *B. cockerelli* como *D. citri* son vectores de la bacteria *Candidatus Liberibacter* asociada con enfermedades en tomate, chile y papa y causante de la enfermedad de Huanglongbing (HLB) en cítricos, respectivamente (Pérez-González *et al.* 2015; Melgoza *et al.* 2018).

La aplicación de estos agentes consiste principalmente en forma de conidios, que a menudo se combinan con otros materiales para facilitar el modo de aplicación, proteger al conidio, además de estabilizarlos durante el período de almacenamiento (Meikle *et al.* 2008). Se han evaluado algunos polímeros usados como adherentes en las formulaciones de hongos entomopatógenos como la goma arábiga (goma de *Acacia*), la cual es considerada un emulsionante estable para la entrega segura y eficaz de componentes bioactivos (Dhull *et al.* 2019). Existen reportes del uso de goma arábiga para encapsular hongos entomopatógenos (Tolun *et al.* 2016). Además, se reporta que de manera similar a la planta *Acacia*, *Hirsutella* produce un exopolisacárido como protector ante la desecación (Nehad y El-Shamy, 2010; Li *et al.* 2010).

Con base a esto, el objetivo del presente trabajo fue mejorar la viabilidad de conidios de *H. citrifomis* elaborando formulaciones a base de goma de *Acacia* y goma de *H. citrifomis*, además de lograr que tengan una vida de anaquel en los formulados por al menos de tres meses.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Formulación de agentes de control biológico.

Los productos para el control biológico de fitopatógenos, insectos plaga o malezas, están elaborados a base de microorganismos, ya sea solo o en combinación de metabolitos, se conocen como bioformulaciones (Arora y Mishra 2016).

La formulación de agentes bioactivos consiste en la preparación de un producto a partir de un ingrediente activo mediante la adición de sustancias activas (metabolitos), y no activas (inertes) que se combinan para obtener un producto en forma sólida, líquida o en gel (Camacho-Kurmen *et al.* 2015). En cuanto a las formulaciones sólidas, estas pueden ser en forma de granulado, micro-encapsulado o polvo; cuando la aplicación es destinada para ambientes acuáticos, puede consistir en forma de granulado o polvo humectable (Knight *et al.* 2008; Khandelwal *et al.* 2016). Por otro lado, las formulaciones líquidas, constan de suspensiones de la biomasa microbiana en agua, aceites o emulsiones. Para el caso de las emulsiones acuosas, hay que considerar que cuando el agente bioactivo tiene propiedad de ser hidrofílico, este se mezcla con agua para posteriormente agregar un aceite y un surfactante; mientras que en las emulsiones oleas el ingrediente activo se mezcla con aceite, ya que este posee una la naturaleza hidrofóbica (Sousa *et al.* 2013; Tamez-Guerra *et al.* 2020).

Los materiales utilizados en la elaboración del formulado no deben tener actividad biológica sobre animales, plantas o insectos benéficos. Estos materiales deberán ser inocuos al ambiente, presentar características físicas adecuadas para mezclarse con el ingrediente activo, facilitar la aplicación del producto, ser económicamente rentables, además de mejorar las características del producto como extender la vida útil (De la Cruz *et al.* 2019; Cárdenas 2010; Skinner *et al.* 2014).

En el caso de los hongos entomopatógenos, estos se aplican generalmente en forma de conidios como unidad infectiva, que son esporas asexuales inmóviles. Estos se encuentran disponibles comercialmente como mico-insecticidas en forma de formulados

para el manejo de plagas agrícolas como alternativa a los agentes químicos (Meikle *et al.* 2008).

En un estudio realizado por Batta *et al.* (2003), realizaron ensayos para el biocontrol de adultos de tres especies de insectos plaga: *Sitophilus oryzae* (L.), *Rhyzopertha dominica* (F.) y *Tribolium castaneum* (H.). Se aplicaron dos tratamientos, uno en formulación con conidios de *Beauveria bassiana* (Bals) y el segundo únicamente con el ingrediente activo. La formulación consistió en conidios de *B. bassiana* en dos tipos de polvo de tierra de diatomeas, escudo fósil y Sillico-sec. Al finalizar los experimentos, los resultados obtenidos de estas exposiciones mostraron que el porcentaje de mortalidad promedio causada por el tratamiento de los adultos con los hongos formulados fue significativamente mayor que el tratamiento con los hongos no formulados.

Por otro lado, se menciona que se realizaron formulaciones en emulsión del hongo entomopatógenos *Metarhizium anisopliae*, contra adultos del barrenador de los granos (*Rhyzopertha dominica*). Los resultados mostraron porcentajes de mortalidad del 92% con el formulado en emulsión y la cepa Meta1, con el tratamiento no formulado fue del 53.3% y el control sin tratar se obtuvo 13.3% de mortalidad (Batta 2016).

## **2.2 Hongos entomopatógenos y su mecanismo de acción**

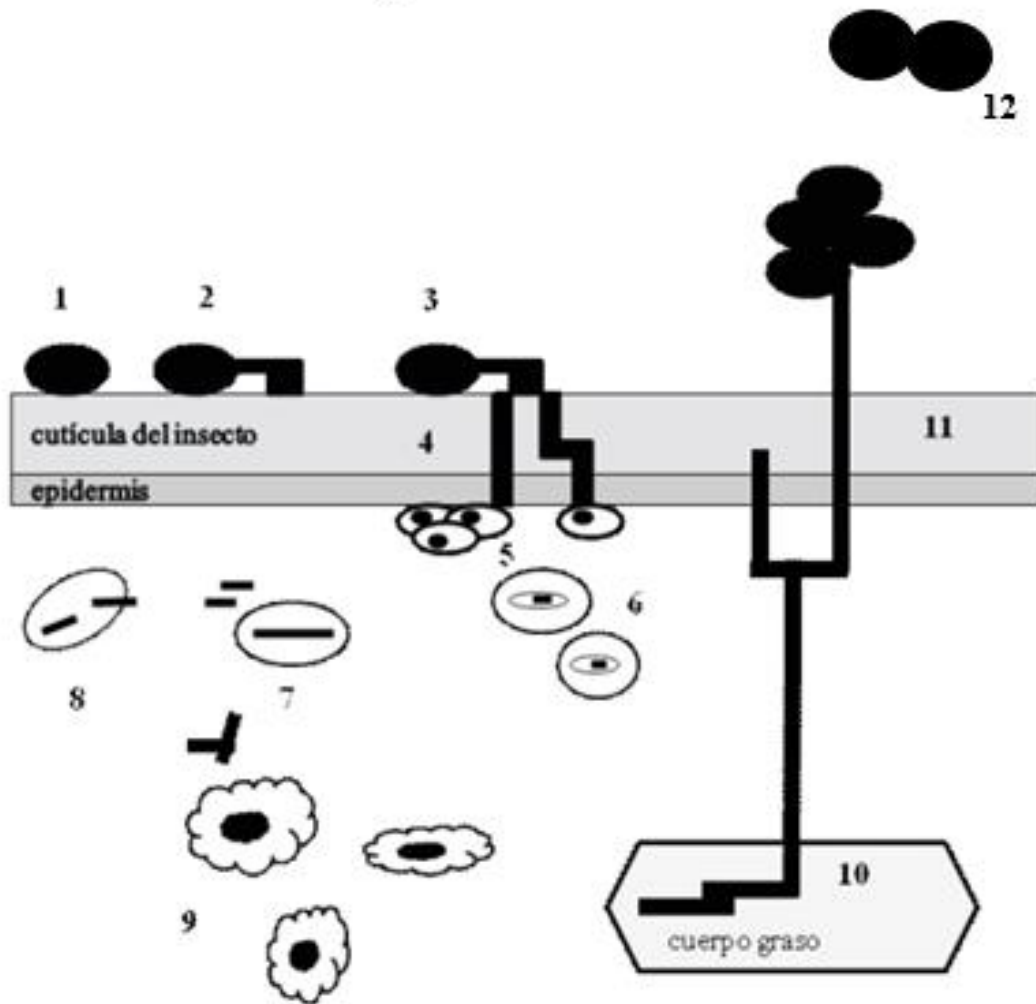
Los hongos entomopatógenos (HEP) son un grupo de microorganismos filogenéticamente diversos que se reproducen a través de esporas sexuales, asexuales o ambas. El termino entomopatógeno hace referencia a aquel microorganismo que tiene la capacidad de atacar insectos cuyo fin es utilizarlo como huésped para desarrollar parte de su ciclo de vida (Mora *et al.* 2018; Litwin *et al.* 2020). Los HEP estuvieron entre los primeros organismos en ser utilizados para el control biológico de plagas, pues más de 700 especies dentro de 90 géneros son patógenos para insectos, la mayoría pertenecientes a las divisiones *Zygomycota* y *Ascomycota* (Khan *et al.* 2012).

El proceso de desarrollo de un hongo entomopatógeno (Fig. 1) comienza cuando los conidios o esporas del hongo penetran normalmente en la cutícula de los insectos, este proceso ocurre de manera física y enzimática. El mecanismo de acción se da primeramente

cuando las esporas del hongo se depositan en la cutícula del insecto, luego las esporas germinan y entran en la cutícula formando un apresorio. A continuación, las hifas se desarrollan en la hipodermis y continúan multiplicándose en el hemocele del insecto causando la muerte. Los períodos y asexuales permanentes ocurren con esporas asexuales que pueden propagarse por desarrollo saprofito en estos individuos muertos (Altinok *et al.* 2019; Valero-Jiménez *et al.* 2016).

### **2.3 Generalidades de *Hirsutella citrifomis***

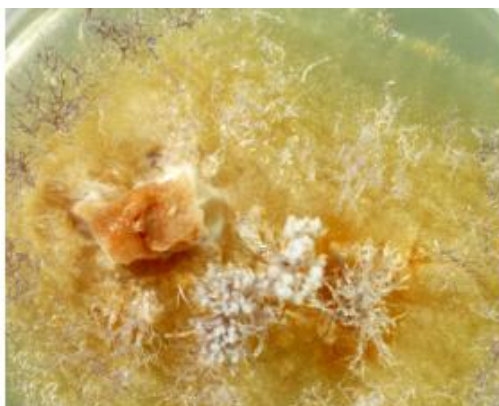
*Hirsutella* es un género de hongos de reproducción asexual perteneciente al filo de los ascomicetos. El género *Hirsutella* fue descrito por Patouillard en 1892 (Hywel-Jones 1997), basado en la especie *H. entomophila* Pat., es uno de los hongos entomopatógenos más abundante e importantes en la naturaleza (Liang *et al.* 2005), que puede desempeñar un papel importante en el control de insectos plaga.



**Figura 1.** Diagrama del desarrollo de un hongo entomopatógeno. (1). El primer paso del proceso es la adhesión de la espora a la cutícula del insecto, (2). Posteriormente, la germinación y formación del apesorio, (3). Penetración de la cutícula, (4). Crecimiento lateral y penetración en la epidermis, (5). Agregación de los hemocitos en el lugar de penetración fúngica, (6). Fagocitosis de cuerpos hifales por células fagocitas del insecto, (7). Transformación a cuerpos levaduriformes, (8). Evasión del sistema inmune, (9). Propagación en el hemocele y muerte del insecto (10). Transformación a cuerpo hifal (11). Esporulación y germinación atravesando la cutícula del insecto, (12). Finalmente, la diseminación de las esporas (Téllez *et al.* 2009).

La morfología de *H. citrifomis* consiste en sinemas esbeltos y simples, compuestos por un haz compacto de hifas longitudinales y septadas. Las células conidiógenas se presentan como monofialídicas con una base elipsoide, que se estrechan abruptamente a esterigmas fialídicos largos con una longitud aproximada de 22.4-34.7  $\mu\text{m}$  de largo y 3.4-4.5  $\mu\text{m}$  de ancho en la base (Meyer 2007; Toledo 2013).

Los conidios se observan de aspecto hialino, de paredes lisas, fusiformes con tamaño aproximado de  $5.6$  a  $7.8 \mu\text{m} \times 2.2$  a  $2.8 \mu\text{m}$  y se encuentran dentro de matriz gelatinosa. Los diámetros de las colonias, después de 7, 14 y 21 días de incubación son de aproximadamente 0.4-1.6 cm, 3.3-3.6 cm y 4.5-4.7 cm, respectivamente (Toledo 2013). Por otro lado, Pérez-González *et al.* (2015) describen que *H. citrifomes* tiene crecimiento tardío, caracterizándose por una baja producción de conidios; en condiciones de laboratorio su crecimiento radial es variable y depende de factores como el tipo de cepa, las características genéticas y naturaleza del sustrato en el que se desarrolla. Además, en cultivo *in vitro*, se reporta que las cepas del hongo presentan tonalidades, que van del blanco al marrón, con la presencia de diferentes exudados (amarillentos y marrones) (Pérez-González *et al.* 2022) (Fig. 2).



**Figura 2.** Crecimiento de *Hirsutella citrifomis* en medios micológicos de aproximadamente 5 semanas (Hall *et al.* 2012).

#### **2.4 *Hirsutella citrifomis* como agente de biocontrol**

El hongo entomopatógeno *Hirsutella citrifomis* es considerado como un agente potencial de biocontrol del psílidos de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) dada su capacidad mostrada en campo de causar epizootias naturales (Fig. 3) (Jiménez *et al.* 2019).



**Figura 3.** Crecimiento de *H. citriformis* en un adulto momificado de *Diaphorina citri* (se observa el sinema que se extiende desde el cadáver) (Hall *et al.* 2012).

Se ha informado que es común observar al hongo *H. citriformis*, controlando liviidos, cuando la humedad relativa es mayor al 80%, lo que es determinante para su crecimiento y esporulación (Étienne *et al.* 2001), a la vez, se informa que, en Estados Unidos, Meyer *et al.* (2007) utilizaron conidios cosechados en sustrato de arroz, para infectar insectos de *D. citri*, muriendo de 9 a 10 días después a la inoculación a 25 °C.

En Tamaulipas, México, Casique-Valdez *et al.* (2011) identificó cepas mexicanas de *H. citriformis* aislados de *D. citri*, tras la inoculación con conidios de *H. citriformis*, los insectos murieron y los sinemas emergieron de los cadáveres de los insectos después de 10 días.

Pérez-González *et al.* (2016) evaluaron cuatro cepas mexicanas de *H. citriformis* en condiciones de semicampo. El bioensayo se realizó en un huerto de limón persa en el estado de Veracruz, México, donde  $1 \times 10^7$  conidios/mL formulados con goma de *Acacia* fueron asperjados contra adultos de *D. citri*. Los brotes fueron retirados y la mortalidad se evaluó a nivel de laboratorio. Los resultados obtenidos, mostraron un porcentaje de mortalidad de 50.6 a 51.05%, lo que demostró que *H. citriformis* podría ser una alternativa prometedora para combatir esta enfermedad que ataca a los cítricos, por lo que era necesario realizar más estudios a nivel de campo. Posteriormente, se cultivaron cuatro cepas de *H. citriformis* en diferentes sustratos para eficientar la producción de conidios en fermentación bifásica (cultivo en agar y cultivo en sustrato) con tres diferentes sustratos en grano: avena (*Avena sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) y sorgo (*Sorghum bicolor*

L.). Los resultados confirmaron la posibilidad de incrementar la producción de conidios de *H. citriformis* en sustratos naturales sin reducir su patogenicidad contra *D. citri* (Pérez-González *et al.* 2017).

En un trabajo anterior realizado por Palacios-Vázquez (2020), se prepararon diferentes formulaciones, encapsulando los conidios a diferentes concentraciones de gomas de *Acacia* e *Hirsutella*, y se determinó su viabilidad luego del almacenamiento en a 25 °C y 4 °C, para estimar su estabilidad hasta por 45 días. Los resultados mostraron que, a altas concentraciones de gomas, se redujo la viabilidad de los conidios de *H. citriformis*, pero la viabilidad a baja concentración (0.5%), no se redujo durante un mes a temperatura ambiente y hasta 45 días en refrigeración.

## **2.5 Producción de exopolisacáridos en *Hirsutella* spp.**

Los estudios sobre la estructura y actividades de los polisacáridos son la premisa para su aplicación en el campo de la medicina y el cuidado de la salud, ya que han demostrado poseer numerosas actividades biológicas tales como inmunoestimulantes, antioxidantes, antitumorales y antimicrobianas (Meng *et al.* 2015). Mahapatra y Banerjee (2013) mencionaron que la producción de exopolisacáridos (EPS) a partir de hongos, depende del tipo de cepa fúngica utilizada, las condiciones físicas mantenidas durante la fermentación y el tipo de componentes del medio aplicados para dicha producción. Entre los hongos que se destacan por producir EPS están *Hirsutella* spp., *Alternaria solani*, *B. bassiana* y *Cordyceps* spp., entre otros. Se ha informado que la actividad antibacteriana de los EPS producidos por *Hirsutella* sp., mostraron mayor efectividad contra bacterias Gram positivas, especialmente contra *Bacillus subtilis* y *Micrococcus tetragenus* comparado a otros EPS (Li *et al.* 2010). Además, Leung *et al.* (2008) mencionaron que el extracto de EPS de *H. sinensis* producido en cultivo líquido, mostró actividad antioxidante moderada en comparación con Trolox, utilizado como antioxidante de referencia en el ensayo.

Por otro lado, Li *et al.* (2010) investigó el medio de fermentación óptimo para la producción de EPS por *Hirsutella* spp, logró la caracterización química de los EPS, los cuales contenían principalmente monosacáridos como manosa, galactosa y glucosa, con

un peso molecular de 23 kDa. De igual manera, Pérez-González (2015) caracterizó exudados cristalinos producidos por 8 cepas de *H. citrifomis* durante su crecimiento vegetativo, los cuales al ser analizados el método del fenol sulfúrico dio reacción colorimétrica para carbohidratos, los cuales tienen naturaleza de EPS.

## **2.6 *Diaphorina citri* como insecto plaga**

El psílido asiático de los cítricos, *D. citri*, es una especie invasora que se ha convertido en la plaga más severa de los cítricos en todo el mundo. El insecto fue descrito por primera vez en Taiwán por Satoru Kuwayama en 1907, es nativo de Asia (Kuwayama 1931; Halbert y Manjunath 2004). El psílido asiático de los cítricos es el vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, la cual es causante de la enfermedad conocida como Huanglongbing o enverdecimiento de los cítricos (Grafton *et al.* 2013). El HLB es considerada la enfermedad más destructiva de los cultivos citrícolas del mundo, ya que en los árboles infectados se reduce su vida útil y se presenta una disminución en la calidad del fruto (Hall *et al.* 2012; Garzo *et al.* 2012) además puede causar la muerte de estos.

## **2.7 Importancia de la citricultura en México**

Una de las actividades agrícolas más importantes en México es la citricultura, ya que México ocupa el cuarto lugar en producción de cítricos a nivel mundial. Se reporta una superficie de 526 mil hectáreas de estos frutales, distribuidas en 23 Entidades Federativas, con una producción de 6.7 millones de toneladas anuales cuyo valor asciende los 8 mil 50 millones de pesos. En la producción nacional de limón, naranja, mandarina, toronja y lima participan 67 mil familias mexicanas, donde se generan 70 mil empleos directos y 250 mil indirectos (SENASICA 2019).

## **2.8 *Bactericera cockerelli* como insecto plaga**

El psílido *Bactericera cockerelli* es una de las plagas agrícolas más importante, ya que llega afectar al cultivo de chile (*Capsicum* spp.), papa (*Solanum tuberosum* L.) y



tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) en Estados Unidos Americanos, México y algunos países de América Central (Liu *et al.* 2019). La especie fue descrita por primera vez por Karel Šulc en 1909 a partir de especímenes recolectados en Colorado, EUA. Este insecto se alimenta del floema provocando un amarillamiento y clorosis del follaje, además de ser el vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter solanacearum*, que causa diversas enfermedades en cultivos de solanáceas, “permanente del tomate”, en cultivos de tomate, “Zebra chip” en papa y en Chile produce una enfermedad descrita como “brotes cloróticos” (Melgoza *et al.* 2018; Castillo *et al.* 2019).

### **2.9 Importancia de *B. cockerelli* en México**

Tan solo en el cultivo de papa, dependiendo de la etapa de desarrollo en que las plantas son infectadas por el psílido, el rendimiento de los tubérculos disminuye entre el 10 y 100%, además, como consecuencia, las pérdidas económicas en cuanto a los costos de producción son en promedio \$100,000 pesos por hectárea. Actualmente, el control de *B. cockerelli* se basa principalmente en la aplicación de insecticidas químicos, por lo que es necesario establecer un sistema de control integrado para esta plaga que incluya el uso de variedades tolerantes e insecticidas biológicos (INIFAP 2013).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El control de insectos plaga en la agricultura se ha basado principalmente en el uso de insecticidas químicos, los cuales han mostrado un favorable impacto en reducir pérdidas en cosechas, sin embargo, también han causado efectos adversos en la calidad del ambiente, la biodiversidad, la salud humana, costos de producción y desarrollo de resistencia en las plagas.

Existen plagas agrícolas como *Diaphorina citri* y *Bactericera cockerelli* que han disminuido la producción de cítricos y solanáceas generando problemas al sector alimenticio y por ende a la economía. Por lo anterior, el control biológico se considera un componente importante en la sustentabilidad de la agricultura para el control de plagas, por lo que en este estudio se elaboraron formulados a base de *H. citrifomis* en combinación de gomas de *Acacia* e *Hirsutella* para su aplicación en control biológico.

#### **4. HIPÓTESIS**

La formulación de conidios de *Hirsutella citrifomis* producidos por fermentación bifásica y encapsulados en goma de *Acacia* o de *Hirsutella*, mantiene su estabilidad en anaquel por al menos tres meses.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Mantener la viabilidad de conidios de *Hirsutella citriformis* por al menos tres meses mediante diferentes formulaciones con base de goma de *Acacia* y de *Hirsutella*.

### **5.2 Objetivos específicos**

- 1.** Analizar el efecto de cada componente del formulado sobre la viabilidad de conidios de *H. citriformis*.
- 2.** Evaluar la vida de anaquel de los conidios durante tres meses en los diferentes formulados a dos temperaturas diferentes ( $25 \pm 2$  °C y  $4 \pm 1$  °C).
- 3.** Determinar la estabilidad de los formulados con base en su pH y pureza.

## 6. MATERIAL Y MÉTODO

### 6.1 Activación de cepas.

Las cepas empleadas para la producción de conidios para los formulados fueron la OP-Hir-10 y OP-Hir-3 provenientes de Yucatán y Tabasco respectivamente, ambas fueron aisladas de insectos micosados por *H. citriformis*. Para la producción de goma se empleó la cepa OP-Hir-9 aislada de insectos micosados provenientes del estado Quintana Roo, México. Para la obtención del primer inóculo, la cepa se sembró por transferencia (tomando un fragmento del hongo con un bisturí y pasándolo al medio de cultivo) en cajas de Petri con agar papa dextrosa, adicionado con extracto de levadura al 1.0%, las cajas de Petri se incubaron a  $25 \pm 2$  °C con luz indirecta y fotoperiodo de 12:12 horas durante 5-6 semanas hasta obtener abundante esporulación.

### 6.2 Producción de goma de *H. citriformis*.

La producción de goma se realizó en matraces de 500 mL con 250 mL de caldo papa dextrosa (BD Difco™), adicionado con extracto de levadura al 1%, los cuales fueron inoculados con 1 cm<sup>2</sup> de *H. citriformis* cultivada en agar. Los matraces se incubaron por 9 días a  $25 \pm 2$  °C con una agitación de 150 rpm. Los cultivos se centrifugaron (Thermo Fisher Scientific™) por cinco minutos a 10,000 rpm para separar el micelio, se pasó el sobrenadante a un vaso de precipitado, se le añadió dos volúmenes de isopropanol, se mantuvieron en reposo por 12 h, y se realizó un segundo lavado en isopropanol por 12 h, se secó en una balanza infrarroja (AND AD-4715) (García-Ochoa *et al.* 2000).

### 6.3 Cultivo bifásico de *H. citriformis* (producción de conidios).

Para la preparación del cultivo, se realizó la metodología propuesta por (Pérez-González *et al.* 2017), en donde se manejaron dos fases de producción para la obtención de conidios: en cultivo sólido en agar y en cultivo sólido en un sustrato vegetal. En la primera fase (preparación del inóculo) la extracción de los conidios se realizó a partir de

cultivo sólido en agar papa dextrosa adicionado con extracto de levadura al 1% (BD Difco™), las placas de Petri con el hongo se incubaron de 6 a 7 semanas a  $25 \pm 2$  °C, la obtención de conidios se realizó bajo condiciones de esterilidad. A cada caja de Petri se le añadieron 10 mL de agua destilada estéril, posteriormente se suspendieron los conidios raspando la superficie de la caja con un asa bacteriológica y transfiriéndolos a un tubo de 50 mL.

Para la segunda fase experimental, cuyo fin fue incrementar la producción del inóculo, se utilizó sustrato vegetal (avena en grano). Esto se realizó en bolsas de plástico de polipapel, se pesaron 200 g de avena en grano, los cuales fueron lavados 3 veces para eliminar las partículas ajenas al grano, se dejó remojar por 24 h adicionando oxitetraciclina al 50% y transcurrido el tiempo se desechó el agua. Al sustrato se le añadió salvado al 2% y se esterilizó por 30 min en dos eventos de 24 horas de separación. El sustrato se dejó 2 días en reposo para proseguir a la inoculación. A cada recipiente se le añadieron 40 mL de una suspensión de  $1 \times 10^7$  conidios/mL a partir de la producción de la fase 1, finalmente los cultivos fueron incubados a  $25 \pm 2$  °C durante 14 días.

#### **6.4 Concentración de conidios.**

Los conidios se desprendieron mecánicamente del sustrato vegetal, con una espátula estéril, en 250 mL de agua destilada estéril, y se concentraron mediante centrifugación (Thermo Fisher Scientific™), en tubos cónicos de 50 mL, por 10 min a 10,000 rpm. El sobrenadante se eliminó dejando aproximadamente de 5 a 10 mL del precipitado de cada uno de los tubos cónicos utilizado. Posteriormente, los conidios se cuantificaron en cámara de Neubauer, y se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL.

#### **6.5 Viabilidad inicial de conidios.**

Para establecer la viabilidad inicial del ingrediente activo en una formulación, debe tener una germinación superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 h (Vélez *et al.* 1997). Para ello, se calculó la cantidad de conidios viables, inoculando 10 µL de una

suspensión de  $1 \times 10^7$  conidios/mL sobre cuadros de agar de  $1 \text{ cm}^2$  en cajas de Petri, se incubaron durante 72 h a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , tiempo reportado por Pérez-González *et al.* (2017) para la germinación de los conidios de *H. citriformis*, transcurrido el tiempo, los conidios se tiñeron con lactofenol azul de algodón y se observaron al microscopio. Se contabilizaron 100 conidios germinados o no, con los datos obtenidos se obtuvo el porcentaje de conidios germinados (Tamayo-Mejía *et al.* 2015), el conteo de conidios se realizó al menos en tres ocasiones.

### **6.6 Efecto de los diferentes componentes del formulado en la viabilidad de conidios de *H. citriformis*.**

Antes de iniciar con la elaboración de un formulado, es necesario conocer si los ingredientes del mismo no afectan la viabilidad de los conidios, para evaluar cada uno de los ingredientes se prepararon medios de cultivo con los porcentaje a utilizar de los ingredientes del formulado a probar (aceite vegetal líquido al 3%, aceite vegetal en polvo al 3%) además de conidios de *H. citriformis* a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL, con el fin de evaluar la germinación del ingrediente activo usando para ello el método previamente descrito. La evaluación se realizó en al menos 3 ocasiones.

### **6.7 Preparación del formulado.**

Los componentes que se usaron en la formulación fueron: conidios de *H. citriformis* (ingrediente activo), goma de *Acacia* y goma de *H. citriformis* cepa OP-Hir-9 (adherentes) y aceite vegetal (hidratación), las concentraciones y combinaciones de los componentes se presentan en la tabla 1.

Para la elaboración de los formulados se ajustó la concentración final de goma de *Acacia* y/o *Hirsutella* dependiendo el caso (Tabla 1), seguido de ello, se agregó el aceite vegetal al 3%, se llevó a autoclave por 15 min a 15 lb a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , después de lo cual se agitó en un vortex para homogenizar la mezcla. Se dejó enfriar y se ajustó a una concentración  $1 \times 10^7$  conidios/mL.

**Tabla 1. Componentes de las diferentes formulaciones.**

<b>Cepa</b>	<b>Goma Acacia</b>	<b>Goma <i>Hirsutella</i></b>	<b>Nomenclatura</b>
OP-Hir-10 (Yucatán)	0.50%		FP1 GA
		0.50%	FP2 GH
	0.30%	0.20%	FP3 GA.2+GH.3
	0.20%	0.30%	F4 GA.3+GH.2
Control	Agua		FP Control
OP-Hir-3 (Tabasco)	0.50%		FP1 GA
		0.50%	FP2 GH
	0.30%	0.20%	FP3 GA.2+GH.3
	0.20%	0.30%	F4 GA.3+GH.2
Control	Agua		FP Control

### **6.8 Vida de anaquel de los conidios.**

Se determinó la vida de anaquel de los formulados de *H. citriformis* almacenados a dos temperaturas diferentes ( $25 \pm 2$  °C y  $4 \pm 1$  °C).

Las evaluaciones se realizaron inmediatamente después de su elaboración, a los 0, 30, 60, 90, 120, 150 días mediante conteo de conidios (72 h después de sembrados), la evaluación se realizó por duplicado (Tamayo-Mejía *et al.* 2015).

### **6.9 Efecto del pH en la estabilidad de los formulados.**

Para determinar el efecto de la acidez o alcalinidad en la estabilidad de los formulados, se prepararon muestras en proporción 1:10 con agua destilada estéril, se homogenizaron y se dejó reposar por una hora con tres repeticiones. Con un potenciómetro previamente calibrado se determinó el pH. La evaluación se realizó por duplicado.



### 6.10 Prueba de pureza.

Para asegurarse de que el formulado sea axénicos, se realizó una prueba de pureza, en donde se utilizaron cajas de Petri con agar PDA con extracto de levadura al 1%. Posteriormente, se inoculó 0.1 mL en la superficie del medio de la concentración inicial. Se emplearon 2 cajas por muestra dispersando el inóculo con una varilla de vidrio estéril y fueron incubadas a  $25 \pm 2$  °C por 8 días, finalmente se determinó el porcentaje mediante la fórmula de Cardona *et al.* (2014):

$$\% \text{ de Pureza} = \frac{\text{Número de colonias de interés}}{\text{Número de colonias totales}} \times 100$$

### 6.11 Análisis estadísticos.

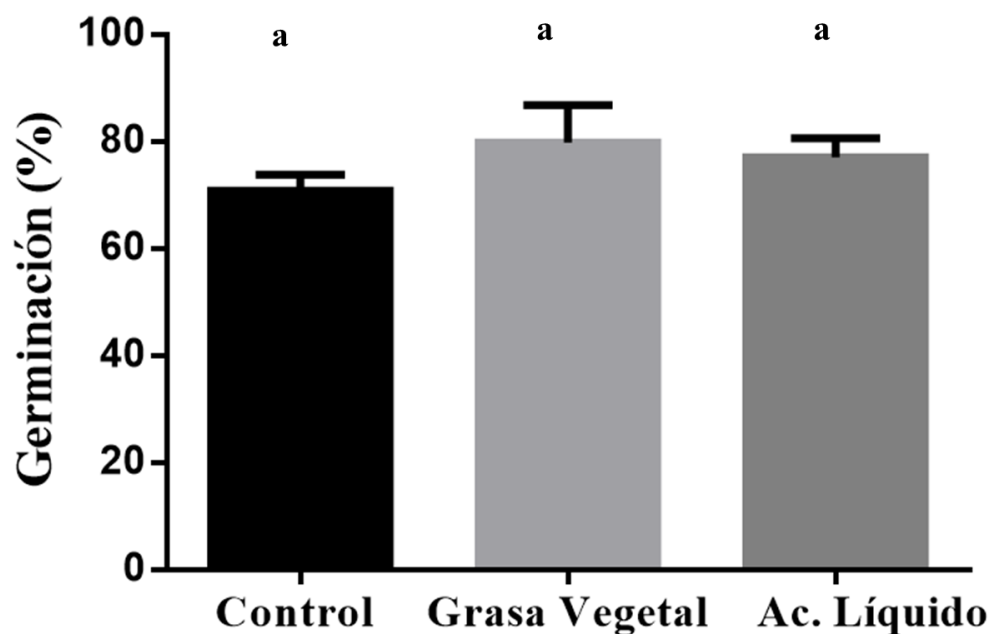
Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 6.0, donde se realizó un análisis de varianza de una vía, tomando como variable independiente cada uno de los tratamientos, y como variable dependiente se consideró la viabilidad y la germinación; en caso de presentar diferencias significativas, se realizó una prueba Tukey, tomando en cuenta una  $P \leq 0.05$ .

Para determinar si la temperatura disminuye la pérdida de viabilidad del ingrediente activo se realizó una prueba *t* de Student, donde se comparó el porcentaje de germinación de los tratamientos a los 90 días.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Efecto de los diferentes componentes del formulado en la viabilidad de conidios de *H. citriformis*.

Los resultados de la prueba de viabilidad de componentes de forma individual mostraron, que los conidios de *H. citriformis* presentaron una germinación del 70.7%  $\pm$  3.025 en el caso del control, del 79.7%  $\pm$  7.04 en presencia de grasa vegetal en polvo y 77%  $\pm$  3.6 en presencia de aceite líquido, por lo no se observaron diferencias significativas entre los aceites y el control ( $F_{2,6}=2.651$ ;  $P \geq 0.05$ ) (Fig. 4). Los formulados adicionados con aceite vegetal fueron descartados, ya que el tiempo de crecimiento se retardó hasta 10 días aproximadamente.



**Figura 4.** Porcentaje de germinación de conidios de *H. citriformis* en presencia de los componentes del formulado (grasa vegetal en polvo 3% y aceite líquido 3%). Las barras representan la desviación estándar (DE) y las letras diferentes indican que en cada grupo existe diferencia significativa al nivel del 0.05 del análisis de comparación de medias de Tukey. Los datos se analizaron mediante ANOVA unifactorial utilizando GraphPad Prism 6.0.

En un estudio realizado por Lopes *et al.* (2011), se evaluó la protección que brindan las formulaciones oleosas en mezclas con conidios de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* (Ma) y *Beauveria bassiana* (Bb), en condiciones de laboratorio. Tanto la viabilidad de los conidios de Ma como los de Bb no se vieron afectados en las suspensiones que contenían una mezcla de aceite de soya, en comparación con aquellos conidios sin formular.

En este estudio, al analizar la viabilidad de los conidios en respuesta a los componentes (Fig. 4), no afectan la germinación, por lo que los ingredientes no afectan la viabilidad de los conidios con respecto al control absoluto. Las ventajas del uso de formulaciones oleosas, es el aumento en la resistencia a los cambios térmicos, como reportó Latifian (2018), quien preparó formulados a base de *Metarhizium anisopliae* con diferentes aceites vegetales, obteniendo estos resultados. También se menciona que el uso de aceites en formulaciones ayuda a la supervivencia de esporas, al mantener su humedad (Arbeláez, 2020).

Se observó un efecto retardante en el crecimiento micelial de *H. citriformis* en presencia del aceite vegetal líquido a base de maíz. La composición típica del aceite de maíz es: palmítico (11%), esteárico (2%), oleico (24.1%), linoleico (61.9%), linolénico (0.7%) y en menor proporción otros ácidos grasos (<1%) (Delucchi *et al.* 2019). Liu *et al.* (2008) mencionan que el ácido palmítico, en altas concentraciones (3.9 mmol/L) mostró un efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de hongos como *Alternaria solani*, *Colletotrichum lagenarium* y *Fusarium oxysporum*. De igual manera, el ácido linoléico (2000  $\mu\text{mol/L}$ ), redujo el crecimiento del micelio. Por el contrario, el ácido oléico (3200  $\mu\text{mol/L}$ ) no tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de los tres hongos probados.

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios sobre los mecanismos antifúngicos de los ácidos grasos se han centrado en el efecto inhibitorio contra los hongos patógenos humanos, mientras que las actividades antifúngicas contra los hongos entomopatógenos aún se desconocen. Por esto se puede inferir, que el contenido de ácidos grasos presentes en el aceite vegetal a base de maíz podría interferir con el crecimiento micelial de *H. citriformis*.

## 7.2 Vida de anaquel de los formulados de *H. citriformis* almacenados a dos temperaturas diferentes ( $25 \pm 2$ °C y $4 \pm 1$ °C).

En cuanto a las evaluaciones del porcentaje de germinación (Fig. 5) para la cepa OP-Hir-3 (Tabasco), los formulados almacenados a 25 °C, presentaron una viabilidad entre el  $94.6\% \pm 1.75$  y el  $96.1\% \pm 1.17$ , mientras que la del grupo control fue de  $91.83\% \pm 2.13$ .

Después de 30 días de almacenamiento, los tratamientos FP1 y FP2 presentaron diferencias significativas con respecto al control ( $F_{1,5}=6.60$ ;  $P \leq 0.05$ ), mientras que la viabilidad en los tratamientos FP3 y FP4 no presentó diferencias en cuanto a la germinación del testigo ( $F_{1,5}=6.60$ ;  $P \geq 0.05$ ), el cual bajó a  $90.1\% \pm 1.32$ .

Al día 60, se observó una disminución del porcentaje de germinación entre el  $87.6\% \pm 4.13$  al  $89\% \pm 2.3$ ; sin embargo, los formulados presentaron mayor estabilidad que el testigo ( $83\% \pm 4.2$ ) ( $F_{4,11}=3.356$ ;  $P \leq 0.05$ ).

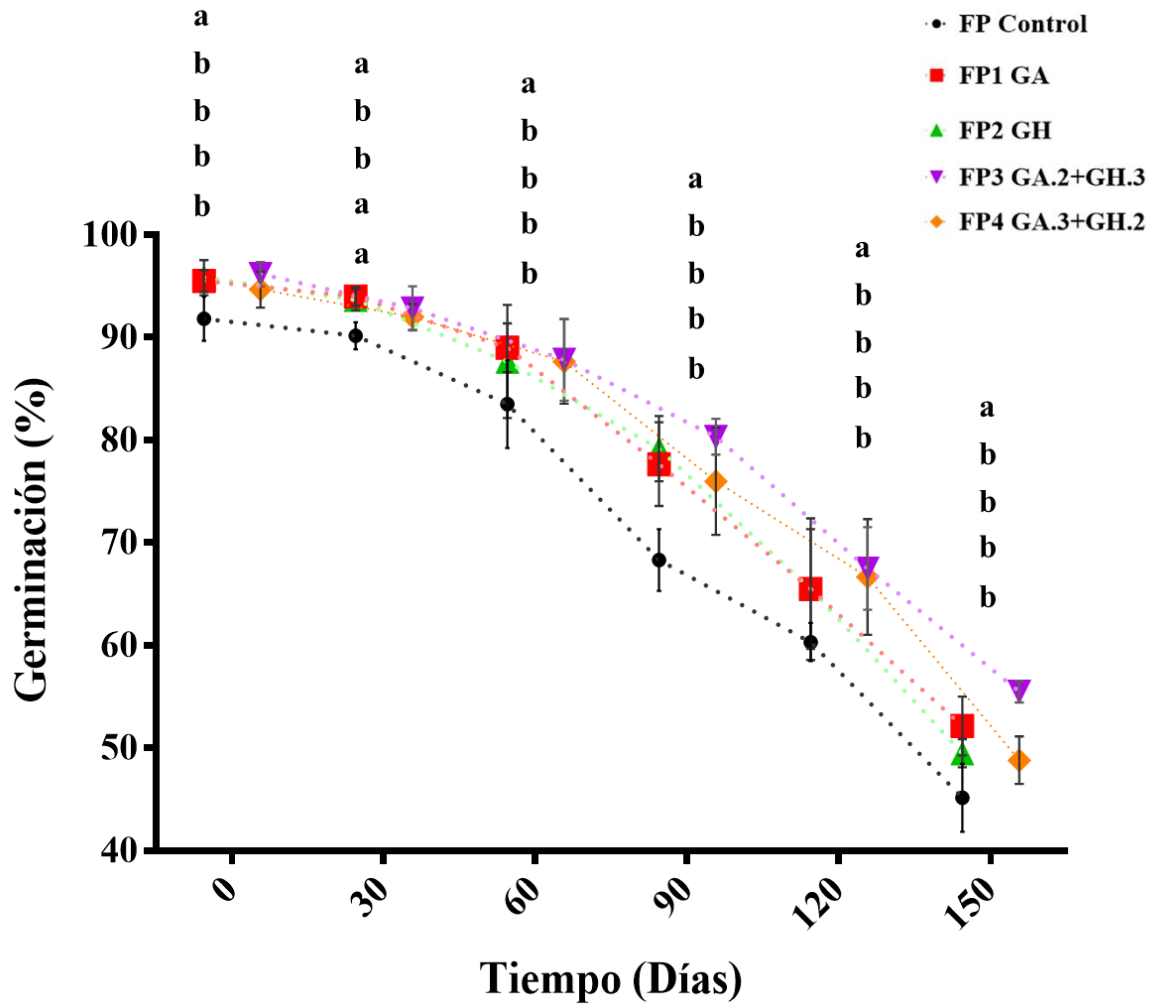
En la evaluación del día 90, el porcentaje de germinación se observa entre el  $76\% \pm 5.2$  al  $80.3\% \pm 1.75$ , mientras que el control presenta un porcentaje del  $68\% \pm 3.01$ , sin embargo, en comparación con el testigo, los formulados presentaron una mayor estabilidad ( $F_{4,11}=3.356$ ;  $P \leq 0.05$ ).

Finalmente, al día 120, se observa una disminución del porcentaje de germinación por debajo del 70%, por lo que los formulados no se consideran viables. Los formulados no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{3,21}=3.072$ ;  $P \geq 0.05$ ).

Referente a los formulados mantenidos a 4 °C (Fig. 6), la viabilidad inicial de los presentó entre el  $94.6\% \pm 1.75$  a  $96.1\% \pm 1.16$ , mientras que la del grupo control fue del  $90.3\% \pm 1.86$ .

Después de 30 días de almacenamiento, la viabilidad se mantuvo en todos los tratamientos.

Luego del día 60, se observó una disminución del porcentaje de germinación de entre  $92.3 \pm 2.33$  al  $92.8\% \pm 1.72$ . Los formulados presentaron mayor estabilidad que el testigo ( $82.3\% \pm 0.51$ ) ( $F_{4,11}=3.356$ ;  $P \leq 0.05$ ).

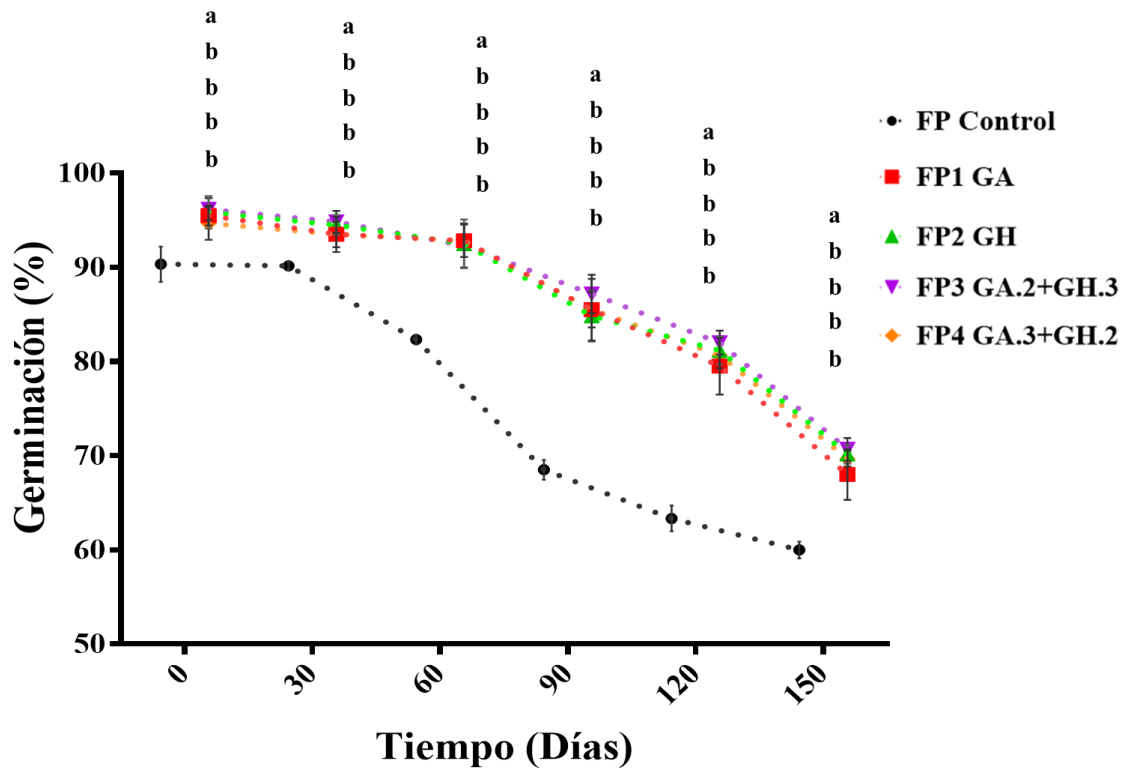


**Figura 5.** Evaluación del porcentaje de germinación de conidios de *H. citriformis* OP-Hir-3 (Tabasco) durante 150 días, almacenados a 25 °C. GA, Goma de Acacia; GH, Goma de *Hirsutella*; FP, Formulado Grasa vegetal. Las barras representan la DE y las letras diferentes indican que en cada grupo existen diferencia significativa al nivel del 0.05 del análisis de comparación de medias de Tukey. Los datos se analizaron mediante ANOVA bifactorial utilizando GraphPad Prism 6.0.

Al día 90, el porcentaje de germinación de los tratamientos fue de  $84.8\% \pm 2.71\%$  al  $87.1\% \pm 2.04\%$ , mientras que el control presentó un porcentaje del  $68.5\% \pm 1.04\%$ .

Después de 120 días, los resultados indicaron una viabilidad entre  $79.5\% \pm 3.01\%$  al  $82\% \pm 1.26\%$ , en comparación con el testigo ( $63.3\% \pm 1.36\%$ ), donde los formulados presentaron una mayor estabilidad ( $F_{4,11}=3.356$ ;  $P \leq 0.05$ ).

Finalmente, a los 150 días se observó una disminución del porcentaje de germinación por debajo del 70%, por lo que los formulados no se consideran viables. No se observaron diferencias entre tratamientos ( $F_{3,21}=3.072$ ;  $P \geq 0.05$ ).



**Figura 6.** Evaluación del porcentaje de germinación de conidios de *H. citriformis* OP-Hir-3 (Tabasco) durante 150 días, almacenados a 4 °C. GA, Goma de Acacia; GH, Goma de *Hirsutella*; FP, Formulado Grasa vegetal. Las barras representan la DE y las letras diferentes indican que en cada grupo existen diferencia significativa al nivel del 0.05 del análisis de comparación de medias de Tukey. Los datos se analizaron mediante ANOVA bifactorial utilizando GraphPad Prism 6.0.

En cuanto a la cepa OP-Hir-10 (Yucatán), los resultados indican una viabilidad inicial de los formulados almacenados a 25 °C de entre el 96%  $\pm$  0.89% y 95%  $\pm$  0.89%, mientras que la viabilidad inicial del grupo control fue del 93.6%  $\pm$  0.51% (Fig. 7).

Después de 30 días de almacenamiento, la viabilidad en los tratamientos se mantuvo entre 93.1%  $\pm$  1.42% y 94%  $\pm$  0.89% por encima del control, el cual bajo a 92%  $\pm$  1.26%.

Al día 60, se observa una disminución en el porcentaje de germinación, que va entre el  $85.5\% \pm 1.04\%$  al  $88.6\% \pm 2.73\%$ . Los formulados presentaron mayor estabilidad que el testigo ( $81.6\% \pm 2.80\%$ ) ( $F_{4,11}=3.356$ ;  $P \leq 0.05$ ).

En la evaluación del día 90, el porcentaje de germinación se observa entre el  $80.8\% \pm 1.72\%$  a  $82\% \pm 1.54\%$ , mientras que el control presenta un porcentaje del  $69.16\% \pm 1.16\%$ . Sin embargo, en comparación con el testigo, los formulados presentaron una mayor estabilidad significativa ( $F_{4,11}=3.356$ ;  $P \leq 0.05$ ).

Al día 120, se observa una disminución del porcentaje de germinación en los tratamientos del  $69.8\% \pm 1.83\%$  al  $72.3\% \pm 0.81\%$ , pero en comparación con el testigo, los formulados presentaron mayor estabilidad significativa ( $F_{4,11}=3.356$ ;  $P \leq 0.05$ ).

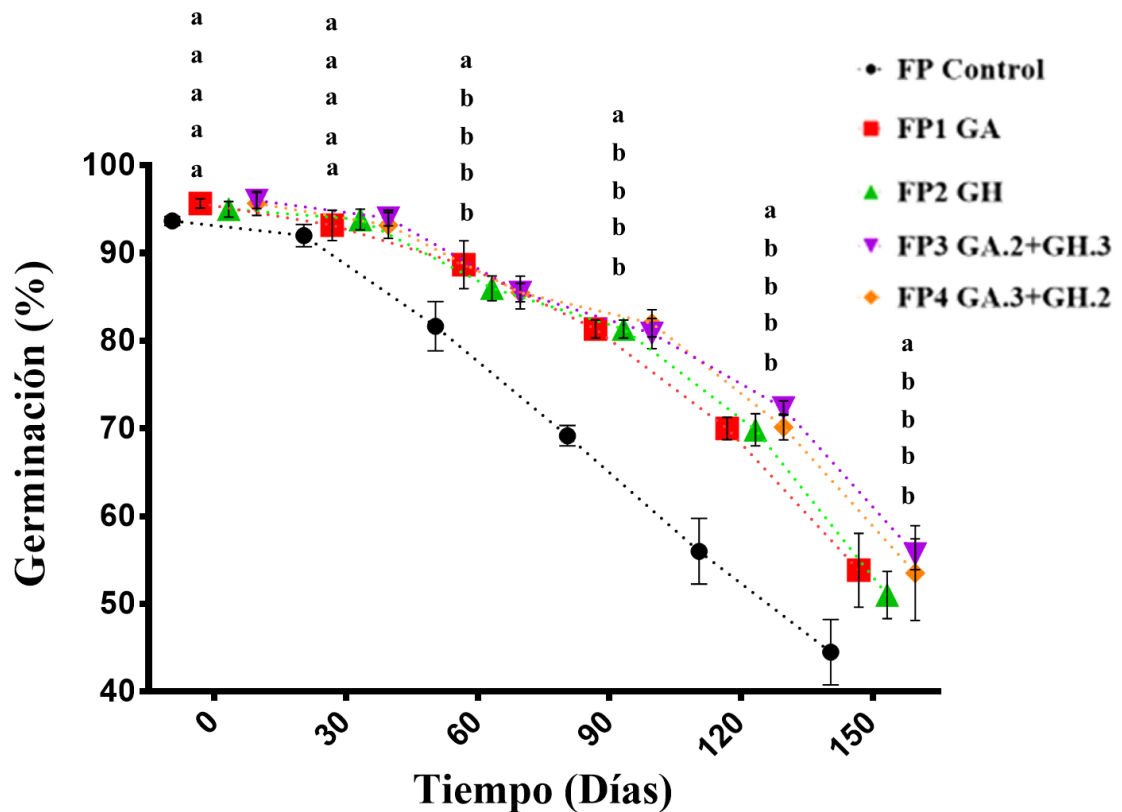
Finalmente, al día 150, el porcentaje de germinación de los tratamientos no se consideran viables. Tras el análisis, los formulados no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{3,21}=3.072$ ;  $P \geq 0.05$ ).

En cuanto a la viabilidad en refrigeración a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la viabilidad inicial de los formulados se presentó entre  $95\% \pm 0.89\%$  y  $96\% \pm 0.89\%$ , mientras que la del grupo control fue del  $93.6\% \pm 0.51\%$  (Fig. 8).

Después de 30 días de almacenamiento, la viabilidad se mantuvo entre  $93.8\% \pm 0.75\%$  a  $94.3\% \pm 1.03\%$  en todos los tratamientos por encima del control, el cual bajó a  $92.6\% \pm 1.21\%$ .

Luego del día 60, se observó una disminución del porcentaje de germinación de entre  $90.6\% \pm 1.21\%$  a  $92\% \pm 1.41\%$ . Sin embargo, los formulados presentaron mayor estabilidad que el testigo ( $85.6\%$ ) ( $F_{4,11}=3.356$ ;  $P \leq 0.05$ ).

Al día 90, el porcentaje de germinación se observó entre  $86.6\% \pm 1.21\%$  a  $87.8\% \pm 1.16$ , mientras que el control presentó un porcentaje del  $72.3\% \pm 0.81\%$ .

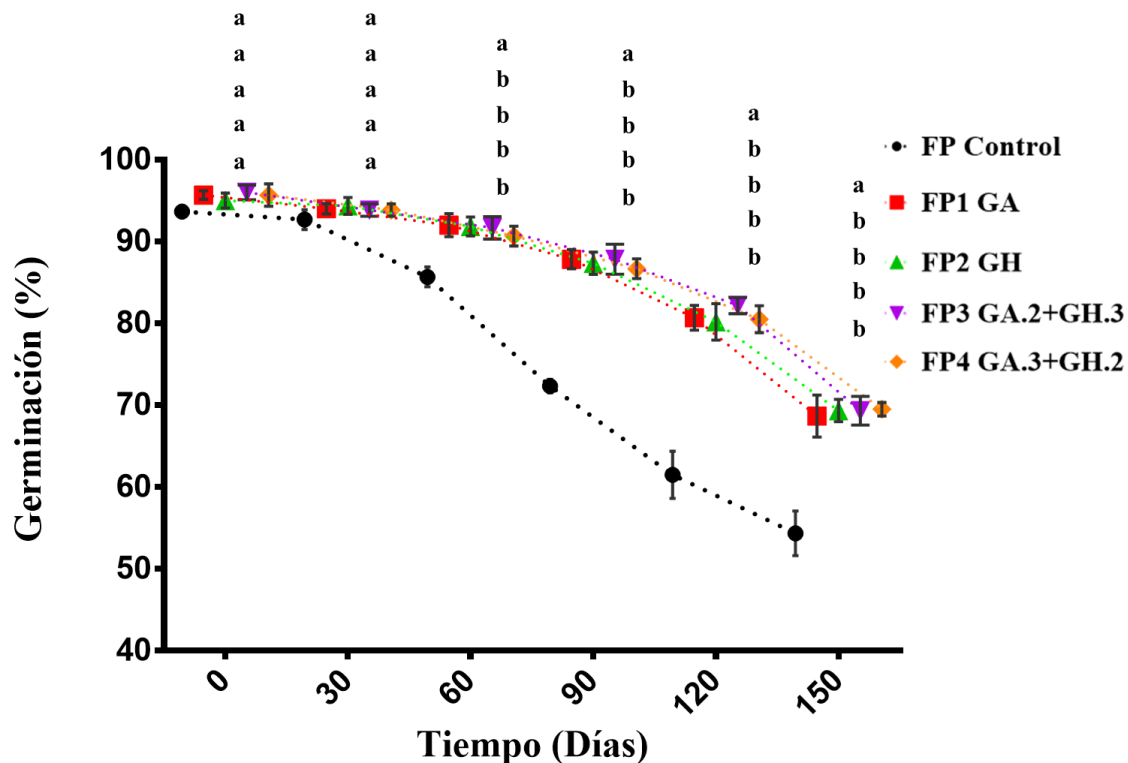


**Figura 7.** Evaluación del porcentaje de germinación de conidios de *H. citriformis* OP-Hir-10 (Yucatán) durante 150 días, almacenados a 25 °C. GA, Goma de Acacia; GH, Goma de *Hirsutella*; FP, Formulados Grasa vegetal. Las barras representan la DE y las letras diferentes indican que en cada grupo existen diferencia significativa al nivel del 0.05 del análisis de comparación de medias de Tukey. Los datos se analizaron mediante ANOVA bifactorial utilizando GraphPad Prism 6.0.

Después de 120 días, el porcentaje de germinación indicó una viabilidad de  $80.1\% \pm 2.22\%$  a  $82.1\% \pm 0.98\%$  en los tratamientos, que en comparación con el testigo ( $61.5\% \pm 2.88\%$ ), donde los formulados presentaron mayor estabilidad ( $F_{4,11}=3.356$ ;  $P \leq 0.05$ ).

Finalmente, a los 150 días, se observó una disminución del porcentaje de germinación de  $69.5\% \pm 0.83\%$  a  $68.6\% \pm 2.58\%$ , por lo que los formulados ya no se consideran viables. Los formulados no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{3,21}=3.072$ ;  $P \geq 0.05$ ).





**Figura 8.** Evaluación del porcentaje de germinación de conidios de *H. citriformis* OP-Hir-10 (Yucatán) durante 150 días, almacenados a 4 °C. GA, Goma de Acacia; GH, Goma de *Hirsutella*; FP, Formulado Grasa vegetal. Las barras representan la DE y las letras diferentes indican que en cada grupo existen diferencia significativa al nivel del 0.05 del análisis de comparación de medias de Tukey. Los datos se analizaron mediante ANOVA bifactorial utilizando GraphPad Prism 6.0.

Las formulaciones más efectivas fueron las que se mantuvieron almacenadas a una temperatura de 4 °C, las cuales mantuvieron la viabilidad por encima de 70% a los 120 días; en comparación con las almacenadas a 25 °C, que se mantuvieron viables por 90 días. Esto puede deberse a que el uso de aditivos ayudó a la protección del ingrediente activo, como el uso de gomas (*Acacia* e *Hirsutella*) y la grasa vegetal pudiera otorgarle un efecto protector al conidio.

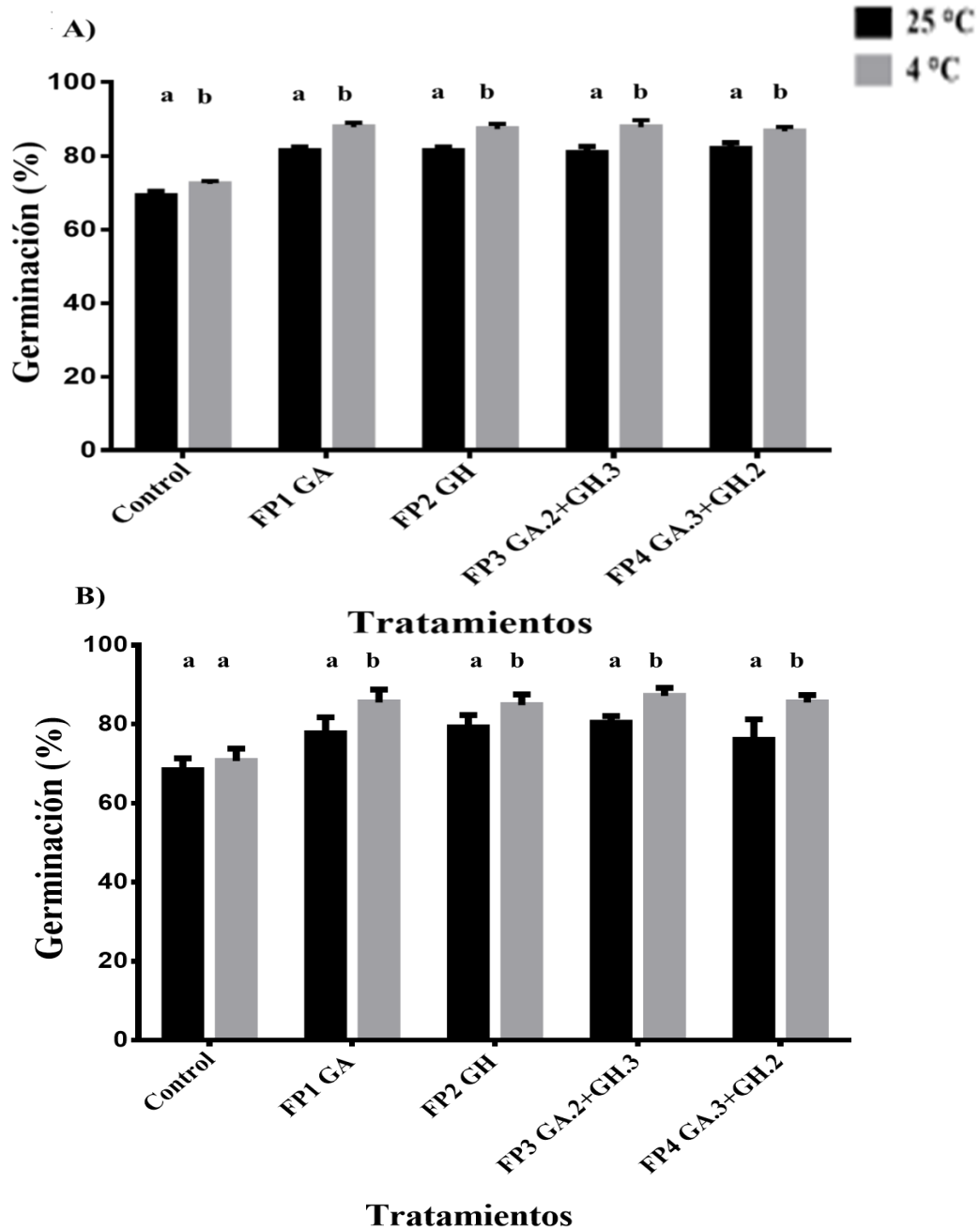
Como mencionan Hidalgo *et al.* (1998), las interacciones entre la temperatura de almacenamiento y los componentes en un bioformulado pueden determinar la longevidad de los conidios. En una formulación de conidios de *B. bassiana*, en presencia de gránulos de aceite de colza hidrogenado, se obtuvo un porcentaje de viabilidad del 84.7% almacenados a 25 °C, y de 92.3% almacenados a 4 °C, después de 45 días.

Al evaluar el efecto de varios aditivos de azúcar sobre la eficacia en la formulación de *B. bassiana*, los resultados mostraron que el uso de gomas o polisacáridos como aditivos para la formulación del ingrediente activo, presentan un efecto nutritivo e incrementan su supervivencia (Mishra *et al.* 2013). Aquellos que contenían glucosa como aditivo, fueron los mejores para el crecimiento y la germinación del hongo.

En cuanto a los análisis de vida de anaquel, los resultados revelaron una variación significativa en la germinación de conidios, mostrando mejores resultados con un 92% de germinación después de 6 meses de almacenamiento a 30 °C. De manera similar, Jin y Custis (2011) indican que hay un efecto significativo en el porcentaje de supervivencia de conidios de *Trichoderma harzianum* encapsulados con polisacáridos.

Seguido de los análisis anteriores, para determinar si la temperatura disminuye la pérdida de la viabilidad del ingrediente activo a los 90 días, los resultados indican que en el caso de la cepa OP-Hir-10 (Yucatán) los resultados muestran que sí hay diferencia significativa entre los dos grupos ( $F_{4,11}=3.356$ ;  $P \leq 0.05$ ) (Fig. 9A), donde el almacenado a 4 °C disminuye la pérdida de viabilidad del ingrediente activo.

En el caso de la cepa OP-Hir-3 (Tabasco), sí se observaron diferencias significativas entre los dos grupos ( $F_{4,11}=3.356$ ;  $P \leq 0.05$ ) a excepción del control (Fig. 9B). De igual manera, el almacenado a 4 °C disminuyó la pérdida de viabilidad del ingrediente activo.



**Figura 9.** Evaluación de la vida de anaquel de *H. citriformis* a almacenados 90 días a dos temperaturas diferentes (25 y 4 °C). A) OP-Hir-10 (Yucatán). B) OP-Hir-3 (Tabasco). GA, Goma de Acacia; GH, Goma de *Hirsutella*; FP, Formulado Grasa vegetal. Las barras representan la DE y las letras diferentes indican que en cada grupo existen diferencia significativa al nivel del 0.05. Los datos se analizaron mediante una prueba *t* de Student utilizando GraphPad Prism 6.0.

Numerosos estudios han discutido el impacto en la estabilidad de conidios bajo diversas condiciones de almacenamiento. En nuestro caso, el almacenamiento de conidios formulados almacenados en refrigeración (4 °C), permitió la disminución de la pérdida de

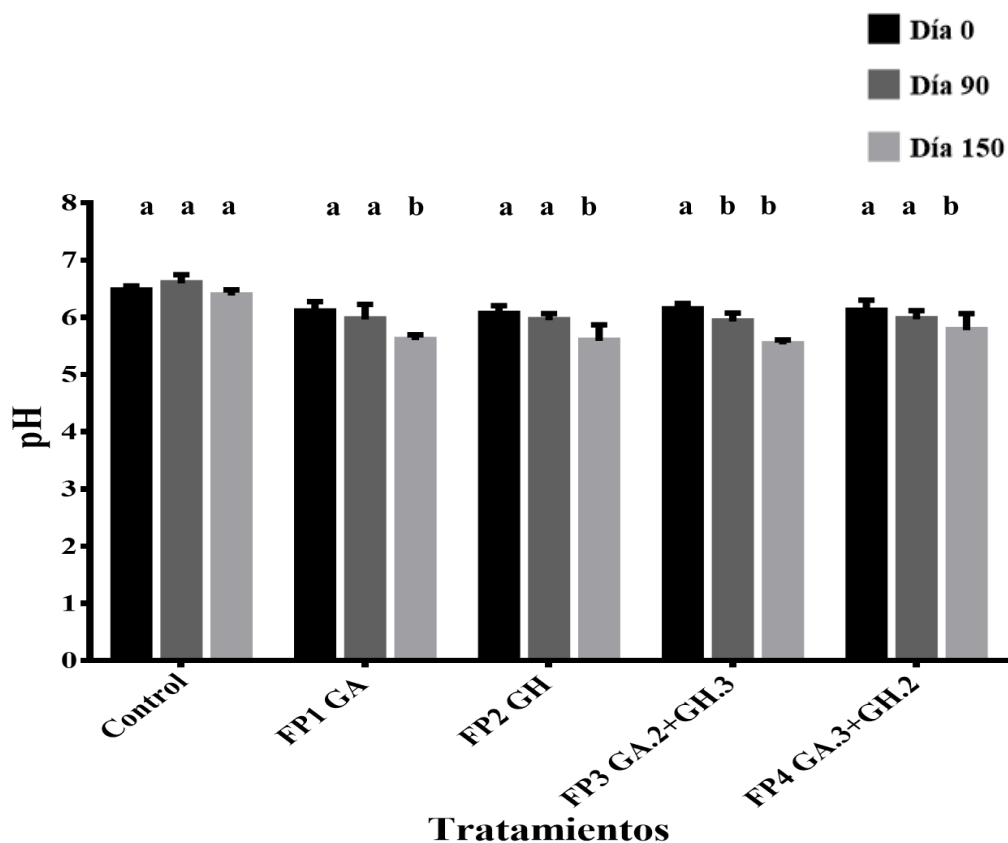
viabilidad mínima hasta por 90 y 120 días. Nuestros resultados concuerdan con Morales *et al.* (2014), cuyas evaluaciones de un formulado oleoso de *B. bassiana*, presentaron mayor porcentaje de germinación a temperatura de refrigeración que a temperatura ambiente. Por lo que se coincide que los mayores tiempos de vida útil, se obtuvieron durante la refrigeración. Esto puede deberse a que el metabolismo celular a temperatura ambiente puede permanecer activo, lo que causa que los conidios almacenen metabolitos tóxicos que pueden reducir drásticamente su viabilidad.

Por otro lado, en condiciones de temperaturas reducidas, (entre 4 °C y 8 °C), es probable que las células fúngicas alcancen un estado metabólico bajo y permanezcan viables durante períodos de tiempo prolongados (Montesinos *et al.* 2015; Lopes y Faria 2019). Los conidios sin formular presentaron una vida útil inferior en comparación con los tratamientos formulados tanto a 25 °C como a 4 °C. Estos resultados indican que los aditivos presentes en los tratamientos otorgan un efecto protector sobre el ingrediente activo, mejorando su estabilidad durante el tiempo de almacenamiento.

### **7.3 Estabilidad de los formulados con base en su pH y pureza**

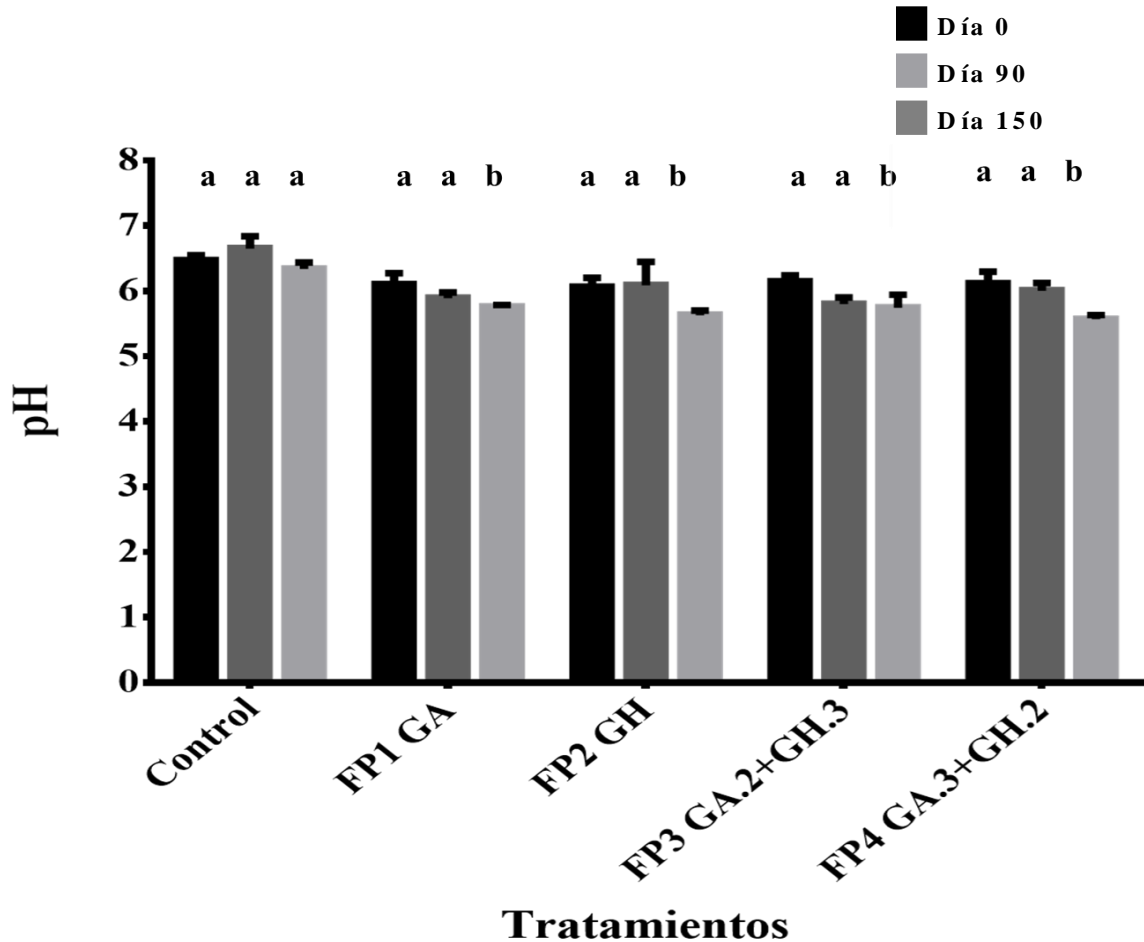
Al analizar los valores del pH de la cepa OP-Hir-3 (Tabasco), los tratamientos almacenados a 25 °C (Fig. 10) permanecieron estables a los 90 días, al no presentar diferencia significativa en comparación al día 0 de la toma de muestra ( $F_{1,11} = 4.844$ ;  $P \geq 0.05$ ), salvo por el tratamiento 3, adicionado con ambas gomas (GA.2+GH.3), el cual presentó diferencias significativas entre el día 0 y 90 ( $F_{1,11}=4.844$ ;  $P \leq 0.05$ ).

Los tratamientos presentaron diferencias significativas entre el día 0 y el 150 ( $F_{1,11}=4.844$ ;  $P \leq 0.05$ ) a diferencia del control, el cual no fue diferente ( $F_{1,11} = 4.844$ ;  $P \geq 0.05$ ).



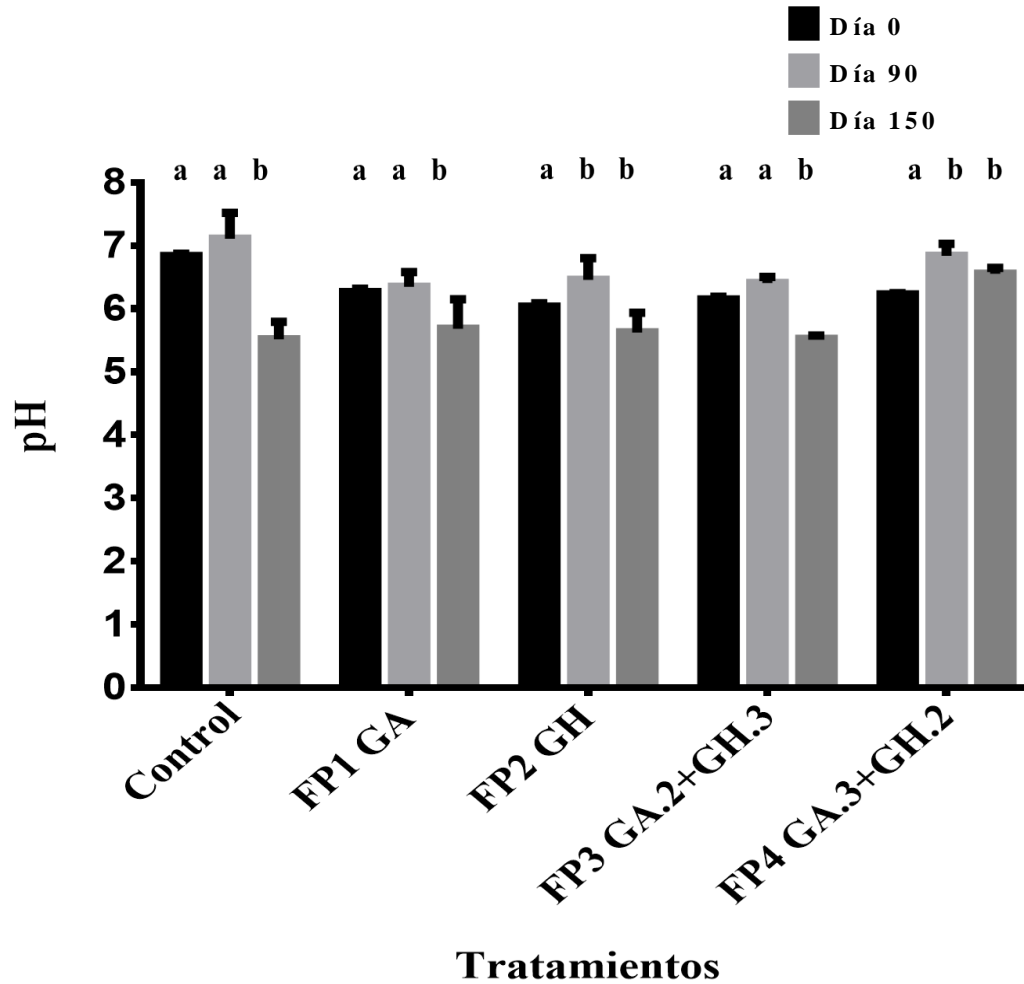
**Figura 10.** Valores de pH de los formulados a base de conidios de *H. citriformis* OP-Hir-3 (Tabasco) al día 0, 90 y 150 almacenados a 25 °C. GA, Goma de *Acacia*; GH, Goma de *Hirsutella*; FP, Formulado Grasa vegetal. Las barras representan la DE y las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) dentro del mismo tratamiento (D0-D90; D0-D150) del análisis de comparación de medias de Tukey. Los datos se analizaron mediante ANOVA bifactorial utilizando GraphPad Prism 6.0.

Todos los tratamientos permanecieron estables a los 90 días almacenados a 4°C (Fig. 11), al no presentar diferencia significativa en comparación al día inicial de la toma de muestra ( $F_{1,11}=4.844$ ;  $P \geq 0.05$ ). Sin embargo, los tratamientos presentaron diferencias significativas entre el día 0 y el 150 ( $F_{1,11}=4.844$ ;  $P \leq 0.05$ ) a diferencia del control, que no presentó diferencias ( $F_{1,11}=4.844$ ;  $P \geq 0.05$ ).



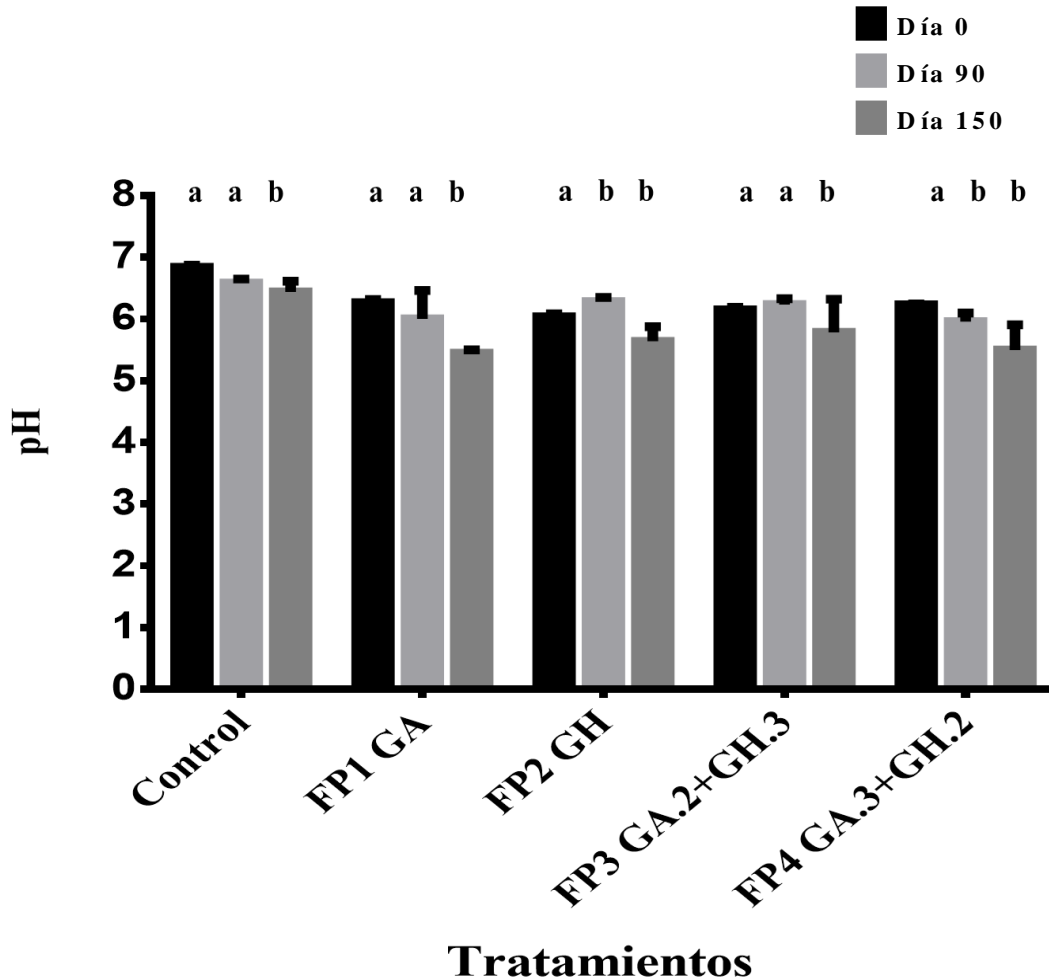
**Figura 11.** Valores de pH de los formulados a base de conidios de *H. citriformis* OP-Hir-3 (Tabasco) al día 0, 90 y 150 almacenados a 4 °C. GA, Goma de *Acacia*; GH, Goma de *Hirsutella*; FP, Formulado Grasa vegetal. Las barras representan la DE y las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) dentro del mismo tratamiento (D0-D90; D0-D150) del análisis de comparación de medias de Tukey. Los datos se analizaron mediante ANOVA bifactorial utilizando GraphPad Prism 6.0.

Al analizar los valores del pH de la cepa OP-Hir-10 (Yucatán), los tratamientos almacenados a 25 °C permanecieron estables a los 90 días ( $F_{1,11}=4.844$ ;  $P \geq 0.05$ ) en comparación al día 0 de la toma de muestra, salvo por los tratamientos 2 y 4, los cuales fueron diferentes entre el día 0 y 90 ( $F_{1,11}=4.844$ ;  $P \leq 0.05$ ). Todos los tratamientos, incluyendo el control, presentaron diferencias significativas entre el día 0 y el 150 ( $F_{1,11}=4.844$ ;  $P \geq 0.05$ ) (Fig. 12).



**Figura 12.** Valores de pH de los formulados a base de conidios de *H. citriformis* OP-Hir-10 (Yucatán) al día 0, 90 y 150 almacenados a 25 °C. GA, Goma de *Acacia*; GH, Goma de *Hirsutella*; FP, Formulado Grasa vegetal. Las barras representan la DE y las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) dentro del mismo tratamiento (D0-D90; D0-D150) del análisis de comparación de medias de Tukey. Los datos se analizaron mediante ANOVA bifactorial utilizando GraphPad Prism 6.0.

Los tratamientos permanecieron estables a los 90 días almacenados a 4 °C, al no presentar diferencia significativa en comparación al día inicial de la toma de muestra ( $F_{1,11}=4.844$ ;  $P \geq 0.05$ ). Sin embargo, todos los tratamientos presentaron diferencias significativas entre el día 0 y el 150 ( $F_{1,11}=4.844$ ;  $P \geq 0.05$ ) incluyendo el control (Fig. 13).



**Figura 13.** Valores de pH de los formulados a base de conidios de *H. citriformis* OP-Hir-10 (Yucatán) al día 0, 90 y 150 almacenados a 4 °C. GA, Goma de *Acacia*; GH, Goma de *Hirsutella*; FP, Formulado Grasa vegetal. Las barras representan la DE y las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) dentro del mismo tratamiento (D0-D90; D0-D150) del análisis de comparación de medias de Tukey. Los datos se analizaron mediante ANOVA bifactorial utilizando GraphPad Prism 6.0.

Diversos autores (Vélez *et al.* 1997; Abadías *et al.* 2001) mencionan que, el valor de pH influye en el crecimiento y germinación del ingrediente activo. El rango de tolerancia al pH de otros hongos entomopatógenos como *Trichoderma* spp., para un favorable crecimiento oscila entre 6.5 a 7.5 (Gurumurthy *et al.* 2016), mientras que para *B. bassiana* se reportan valores de pH de 5 a 13 (Padmavathi *et al.* 2003).

Los valores de pH reportados para el buen crecimiento y esporulación de *Hirsutella* spp., están entre 6.0 y 9.2 (McMacoy *et al.* 1972) y entre 5.5 y 7 (Jaffee y Zehr 1983). En nuestro caso, aun habiendo diferencias en la estabilidad de algunos de los tratamientos, se mantuvo el rango óptimo de pH en todos los formulados hasta por 90 días,



en ambas condiciones de almacenamiento, observando que el pH en el rango de tolerancia antes mencionado, no prohibió la germinación de conidios.

En una formulación, se tiene el riesgo de presentar contaminantes si no se cumplen las buenas prácticas de producción, esto debido a las operaciones manuales requeridas durante el proceso (Grzywacz 2006). Mientras tanto, se indica que los formulados que tengan arriba del 90% de pureza presentan mayor estabilidad y viabilidad del ingrediente activo (Cardona *et al* 2014; SENASA 2014). Esto debido a que los contaminantes presentes pueden generar pérdidas en la eficacia del ingrediente activo, ya que estos pudieran generar efectos inhibitorios por la producción de metabolitos secundarios (Jenkins y Grzywacz 2000; Torres 2009).

Con base en la pureza y la estabilidad de los formulados, el registro indicó una pureza del 100% al día de la toma inicial y transcurridos los 90 y 150 días en todos los tratamientos, tanto para los almacenados a 25 °C como a 4 °C para la cepa OP-Hir-3 (Tabasco) (Tabla 2 y 3).

**Tabla 2.** Pureza de los formulados de *H. citriformis* OP-Hir-3 (Tabasco) almacenados a 25 °C por 0, 90 y 150 días.

Tratamientos	Día 0		Día 90		Día 150	
	% Contaminantes	% <i>Hirsutella</i>	% Contaminantes	% <i>Hirsutella</i>	% Contaminantes	% <i>Hirsutella</i>
FP1 GA	0	100	0	100	0	100
FP2 GH	0	100	0	100	0	100
FP3 GA.2+GH.3	0	100	0	100	0	100
FP4 GA.3+GH.2	0	100	0	100	0	100
Control	0	100	0	100	0	100

**Tabla 3.** Pureza de los formulados de *H. citriformis* OP-Hir-3 (Tabasco) almacenados a 4 °C por 0, 90 y 150 días.

Tratamientos	Día 0		Día 90		Día 150	
	% Contaminantes	% <i>Hirsutella</i>	% Contaminantes	% <i>Hirsutella</i>	% Contaminantes	% <i>Hirsutella</i>
FP1 GA	0	100	0	100	0	100
FP2 GH	0	100	0	100	0	100
FP3 GA.2+GH.3	0	100	0	100	0	100
FP4 GA.3+GH.2	0	100	0	100	0	100
Control	0	100	0	100	0	100

Para el caso de la cepa OP-Hir-10 (Yucatán), la estabilidad de los formulados con base en la pureza, el registro (Tabla 4 y 5) indicó una pureza del 100% al día de la toma inicial, que se mantuvo a los 90 y 150 días en todos los tratamientos, tanto para el almacenamiento a 25 °C como para 4 °C.

**Tabla 4.** Pureza de los formulados de *H. citriformis* OP-Hir-10 (Yucatán) almacenados a 25 °C por 0, 90 y 150 días.

Tratamientos	Día 0		Día 90		Día 150	
	% Contaminantes	% <i>Hirsutella</i>	% Contaminantes	% <i>Hirsutella</i>	% Contaminantes	% <i>Hirsutella</i>
FP1 GA	0	100	0	100	0	100
FP2 GH	0	100	0	100	0	100
FP3 GA.2+GH.3	0	100	0	100	0	100
FP4 GA.3+GH.2	0	100	0	100	0	100
Control	0	100	0	100	0	100

El control de calidad durante el almacenamiento del producto es indispensable para garantizar la calidad de un bioformulado (Viera *et al.* 2018). En nuestro caso, todos los tratamientos presentaron una pureza del 100% bajo las diferentes condiciones de almacenamiento, lo cual indica que el tiempo y el tipo de formulación no afectan de manera negativa a la pureza de los formulados.

**Tabla 5.** Pureza de los formulados de *H. citriformis* OP-Hir-10 (Yucatán) almacenados a 4 °C por 0, 90 y 150 días.

Tratamientos	Día 0		Día 90		Día 150	
	% Contaminantes	% <i>Hirsutella</i>	% Contaminantes	% <i>Hirsutella</i>	% Contaminantes	% <i>Hirsutella</i>
FP1 GA	0	100	0	100	0	100
FP2 GH	0	100	0	100	0	100
FP3 GA.2+GH.3	0	100	0	100	0	100
FP4 GA.3+GH.2	0	100	0	100	0	100
Control	0	100	0	100	0	100

## 8. CONCLUSIONES

- La grasa vegetal presente en el formulado no afecta negativamente la germinación de los conidios de *H. citriformis*.
- Los formulados almacenados a 25 °C mantienen su viabilidad por al menos 90 días.
- Los formulados almacenados a 4 °C mantienen su viabilidad por al menos 120 días.
- La temperatura de almacenado a 4 °C, disminuye la pérdida de viabilidad de los conidios de *H. citriformis*
- En todos los formulados se mantienen dentro del rango óptimo de pH a temperatura de 4 °C y 25 °C por 90 días.
- Todos los tratamientos mantienen la pureza hasta los 150 días, en ambas temperaturas de almacenamiento.

## PERSPECTIVAS

Para complementar los resultados obtenidos, se propone determinar la termotolerancia de los conidios en formulación y la resistencia a la radiación UV.

### **Determinar la termotolerancia de los conidios de *H. citriformis* en los formulados**

Para ello, los conidios formulados se colocarán en tubo de 1.5 mL, luego se mantendrán en un baño de agua a 50 °C durante 0, 60, 120 y 180 min. Posteriormente los conidios serán inoculados en placas de Petri con PDAY para determinar el porcentaje de germinación.

### **Determinar la resistencia UV de los conidios en formulación del hongo *H. citriformis***

Para ello, se sembrarán alícuotas de los formulados en placas de Petri, donde serán expuestas simultáneamente con lámparas UV de 15 watts durante 3 h. Posteriormente, la suspensión de los formulados será inoculada en placas de Petri con PDAY. Después del período de incubación, se verificará la tasa de germinación de los conidios.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abadías M, Teixido N, Usall J, Benabarre A y Viñas I. 2001. Viability, efficacy and storage stability of freeze fried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. *Journal of Food Protection*. 64, (6): 856-861.
- Altinok H, Altinok M y Koca A. 2019. Modes of action of entomopathogenic fungi. *Current Trends in Natural Sciences*, 8:117-124.
- Arbeláez Tabares, M. 2020. Desarrollo de una emulsión W/O para un agente biocontrolador *Bacillus velezensis* UA2208. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.
- Arora NK y Mishra. 2016. Prospecting the roles of metabolites and additives in future bioformulations for sustainable agriculture. *Applied. Soil Ecology*, 107:405-407.
- Batta Y. 2016. Invert emulsion: Method of preparation and application as proper formulation of entomopathogenic fungi. *MethodsX*, 3:119-127.
- Batta, Y. A. 2008. Control of main stored-grain insects with new formulations of entomopathogenic fungi in diatomaceous earth dusts. *International Journal of Food Engineering*, 4(1):1-18.
- Camacho-kurmen J, Gómez-Álvarez M y Villamizar L. 2015. Microencapsulation of a Colombian *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus with Eudragit S100 by spray drying. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58: 468-476.
- Cárdenas G. 2010. Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Fitosanidad*, 14(3): 189-195.
- Cardona LN, Borrego DA, Fernández EP, Sánchez J, Cardona V y Montoya G. 2014. Microbiological evaluation and pathogenicity of a liquid bioformulation of the fungus *Purpureocillium sp.* (strain UdeA 0109) on *Meloidogyne incognita-javanica* stages. *Biotecnología Aplicada*, 31(3):210-215.
- Casique-Valdes R, Reyes-Martinez AY, Sanchez-Pena SR, Bidochka MJ y LopezArroyo JI. 2011. Pathogenicity of *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Cordycipitaceae) to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Florida Entomologist*, 94 (3):703-705.

- Castillo C, Shen F y Burckhardt D. 2019. First record of the tomato potato psyllid *Bactericera cockerelli* from South America. *Bulletin of Insectology*, 72(1):85-91.
- De la Cruz R, Cruz J, De Jesús M, Torres J y Parra R. 2019. Fungi-based biopesticides: shelf-life preservation technologies used in commercial products. *Journal of Pest Science*, (92):1003-1015.
- Delucchi C, Percibaldi M, Trejo M y Eyhéabide G. 2019. Mejoramiento genético del perfil de ácidos grasos del aceite de maíz. *RIA*, 1-10.
- Dhull S, Anju M, Kaushik R y Chawla P. 2019. Application of gum Arabic in nanoemulsion for safe conveyance of bioactive components. *Nanotechnology in the Life Sciences*, 85-98.
- Étienne J, Quilici S, Marival D y Franck A. 2001. Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). *Fruits*, 56:307–315.
- Flint M y Dreistadt S. 1998. *Natural Enemies Handbook: The Illustrated Guide to Biological Pest Control*. University of California Press, pp. 3.
- García-Ochoa F, Santos V, Casas J y Gómez E. 2000. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances* 18:549-579.
- Garzo E, Bonani J, Lopes J y Fereres A. 2012. Morphological description of the mouthparts of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Arthropod Structure & Development*, 41:79-86.
- Grafton E, Stelinski L y Stansly P. 2013. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the Huanglongbing pathogens. *Annual Review of Entomology*, 58(1): 413-432.
- GraphPad Prism version 6.0 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)
- Grzywacz O. 2006. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad vegetal. La Habana, Cuba, 12-23.
- Gurumurthy S, Kumar R, Saabale PR, Meena SK y Mukesh S. 2016. Effect of temperature, pH and various media on growth and sporulation of *Trichoderma* spp. isolates from Uttar Pradesh. *Journal of Plant Development Sciences*, 8(12): 615-618

- Halbert S y Manjunath K. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist*, 87(3):330-353.
- Hall D, Hentz M, Meyer J, Kriss A, Gottwald T y Boucias D. 2012 Observations on the entomopathogenic fungus *Hirsutella citriformis* attacking adult *Diaphorina citri* in a managed citrus grove. *BioControl*, 57(5): 663-675.
- Hywel-Jones N. 1997. *Hirsutella* species associated with hoppers (Homoptera) in Thailand. *Mycological Research*, 101(10):1202-1206.
- INIFAP -Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 2013. Manejo integrado de la punta morada de la papa en el Estado de México. Folleto Técnico No. 2
- Jaffee BA and Zehr EI. 1983. Sporulation of the fungus *Hirsutella rhossiliensis* from the nematode *Criconomella xenoplax*. *Plant Disease*. 67:1265-1267.
- Jenkins N y Grzywacz D. 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agent-assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology*, 10:753-777.
- Jiménez R, García E, López I, Ramírez N y Rodríguez R. 2019. Producción y germinación de conidios del hongo entomopatógeno *Hirsutella citriformis*. *Scientia Fungorum*, 49:1-9.
- Jin X and Custis D. 2011. Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. *Biol Control* 56:202–208.
- Khan S, Guo L, Mamaiti Y, Mijit M y Qiu D. 2012. Entomopathogenic Fungi as Microbial Biocontrol Agent. *Molecular Plant Breeding*, 7:63-79.
- Khandelwal N, Barbole R, Banerjee S, Chate G, Biradar A, Khandare J y Giri A. 2016. Budding trends in integrated pest management using advanced micro and nanomaterials: Challenges and perspectives. *Journal of Environmental Management*, 184: 157-169.
- Knight A, Larson T, Ketner K, Hilton R y Hawkins L. 2008. Field evaluations of concentrated spray applications of microencapsulated sex pheromone for codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology*, 37: 980-989.
- Kuwayama S. 1931. A revision of the Psyllidae of Taiwan. *Insecta matsumurana*, 5(3):117-133.



- Latifian M. 2018. Physicochemical properties effects on different oil formulations on fungus *Metarhizium anisopliae* for control of *Oryctes elegans*. Journal of Entomology, cc:1-10.
- Leung P, Zhao P y Wu J. Y. 2009. Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides from mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungusCs-HK1. Food Chemistry, 114(4): 1251–1256.
- Li R. Jiang X y Guan H. 2010. Optimization of mycelium biomass and exopolysaccharides production by *Hirsutella* sp. in submerged fermentation and evaluation of exopolysaccharides antibacterial activity. African Journal of Biotechnology, 9(2):198-202.
- Liang Z, Han Y, Liu A, y Huang J. 2005. Some entomogenous fungi from Wuyishan and Zhangjiajie Nature Reserves. Three new species of the genus *Hirsutella*. Mycotaxon, 94:349-355.
- Litwin A, Nowak M y Różalska S. 2020. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 19:23-42.
- Liu J, Zhang Z, Begg J, Paderes J, Zou E y Wei X. 2019. Lethal and sublethal effects of entomopathogenic fungi on tomato/potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Šulc) (Hemiptera: Triozidae) in capsicum. Crop Protection, 129:1-22.
- Liu S, Li J, Xu H, Wang J, Gao Y and Wang J. 2008. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. Mycopathologia, 166(2), 93–102.
- Lopes R, Pauli G, Mascarin G and Faria M. 2011. Protection of entomopathogenic conidia against chemical fungicides afforded by an oil-based formulation. Biocontrol Science and Technology, 21(2), 125–137.
- Lopes RB y Faria M. 2019. Influence of two formulation types and moisture levels on the storage stability and insecticidal activity of *Beauveria bassiana*. Biocontrol Science and Technology, 1-14.
- Mahapatra S y Banerjee D. 2013. Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. Microbiology Insights, 6:1-16.
- McMacoy CW, Hill AJ and Kanavel RF. 1972. A liquid medium for the large-scale production of *Hirsutella thompsonii* in submerged culture. Journal of Invertebrate Pathology, 19:370-374.

- Meikle W, Mercadier G, Holst N y Girod V. 2008. Impact of two treatments of a formulation of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) conidia on Varroa mites (Acari: Varroidae) and on honeybee (Hymenoptera: Apidae) colony health. *Experimental and Applied Acarology*, 46:105–117.
- Melgoza C, Del Rosario C, López J, Hernández L, Velarde S y Garzón J, 2018. Presencia de *Candidatus Liberibacter solanacearum* en *Bactericera cockerelli* Sulc asociada con enfermedades en tomate, chile y papa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(3):499-509.
- Meng L, Sun S, Shen Z, Wang P y Jiang X. 2015. Antioxidant activity of polysaccharides produced by *Hirsutella* sp. and relation with their chemical characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 117: 452–457.
- Meyer J, Hoy A y Boucias D. 2007. Morphological and molecular characterization of a *Hirsutella* species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95(2):101-109.
- Meyer JM, Hoy MA y 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.
- Mishra S, Kumar P y Malik A. 2013. Preparation, characterization, and insecticidal activity evaluation of three different formulations of *Beauveria bassiana* against *Musca domestica*. *Parasitology Research*, 112(10):3485–3495.
- Montesinos R, Ayala M y Berlanga A. 2015. Manual para la conservación y mantenimiento de hongos entomopatógenos. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), Unidad de Promoción y Vinculación – SENASICA. México, pp. 17-48.
- Mora M, Castilho A y Fraga M. 2018. Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 84:1-10.
- Morales A, Jarquín R, Gómez J, Díaz O y Marín J. 2014. Evaluación de un formulado de aceite vegetal de *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio para el control de la broca del café. *Fitosanidad*, 18(1): 5-10.

- Nehad EA y El-Shamy AR. 2010. Physiological studies on the production of exopolysaccharide by fungi. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 1(6):1303-1308.
- Padmavathi J, Devi U and Rao M. 2003. The optimum and tolerance pH range is correlated to colonial morphology in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* – a potential biopesticide. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19:469-477.
- Palacios-Vázquez G. 2020. Vida de anaquel de formulación de *Hirsutella citriformis* para su uso en control biológico. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Pérez-González O, Gomez-Flores R y Tamez-Guerra P. 2022. Insight into biological control potential of *Hirsutella citriformis* against Asian citrus psyllid as a vector of citrus huanglongbing disease in America. *Journal of Fungi*. 8(6):573.
- Pérez-González O, Maldonado-Blanco M y Valdez-González A. 2017. Conidial production on different solid substrates and pathogenicity of *Hirsutella citriformis* against *Diaphorina citri* adults. *Southwestern Entomologist*, 42(4):1027-1034.
- Pérez-González O, Rodríguez-Guerra R, López-Arroyo I, Sandoval-Coronado C y Maldonado-Blanco M. 2015. Radial growth, sporulation, and virulence of Mexican isolates of *Hirsutella citriformis* against *Diaphorina citri*. *Southwestern Entomologist*, 40(1):111-120.
- Pérez-González O, Sandoval-Coronado C y Maldonado-Blanco M. 2016. Evaluation of Mexican strains of *Hirsutella citriformis* against *Diaphorina citri* in a semifield bioassay. *Southwestern Entomologist*, 41:361-372.
- Pérez-González O. 2015. Aislamiento, producción y evaluación de la patogenicidad de cepas de *Hirsutella citriformis* Speare para el control de *Diaphorina citri* Kuwayama, vector de la enfermedad Huanglongbing de los cítricos. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Perlatti B, De Souza P, Fernandes J y Forim M. 2013. Polymeric nanoparticle-based insecticides: a controlled release purpose for agrochemicals. *Insecticides-Development of safer and more effective technologies*. IntechOpen. DOI: 10.5772/53355.

- Rusch A, Valantin-Morison M, Sarthou J.-P y Roger-Estrade J. 2010. Biological control of insect pests in agroecosystems. *Advances in Agronomy*. 109:219-259.
- SENASA. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. 2014. Manual de producción y uso de Hongos Entomopatógenos. Laboratorio de Entomopatógenos. Lima-Perú.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, (SENASICA). 2019. Psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama Ficha Técnica No. 77.
- Silveira MI, Aldana-Madrid M, Piri-Santana J, Valenzuela-Quintanar A y Jasa-Silveira G. 2018. Plaguicidas agrícolas: Un marco de referencia para evaluar riesgos a la salud en comunidades rurales en el estado de Sonora, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(1):7-21.
- Skinner M, Parker B. y Su J. 2014. Role of Entomopathogenic Fungi in Integrated Pest Management. *Integrated Pest Management*, 169-191.
- Sousa N, Lobo L, Rodríguez J y Luz C. 2013. New insights of the effectiveness of *Metarhizium anisopliae* formulations and application against *Aedes aegypti* eggs. *Letters in Applied Microbiology*, 57: 193-199.
- Tamayo-Mejía F, Tamez-Guerra P, Guzmán-Franco A y Gomez-Flores R. 2015. Can *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill) (Ascomycetes: Hypocreales) and *Tamarixia triozae* (Burks) (Hymenoptera: Eulophidae) be used together for improved biological control of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Biological Control*. 90:42-48.
- Tamez-Guerra P, Orozco-Flores A y Gómez-Flores, R. 2020. Formulación de agentes de control microbiológico de plagas y fitopatógenos. En *Fundamento y práctica del Control Biológico de plagas y enfermedades*. Editorial del Colegio de Postgraduados: México, pp. 373-400.
- Tamez-Guerra P, Tamayo-Mejía F, Gómez-Flores R., Rodríguez-Padilla C, Damas G, Tamez-Guerra R y Williams T. 2018. Increased efficacy and extended shelf life of spinosad formulated in phagostimulant granules against *Spodoptera frugiperda*. *Pest Management Science*. 74(1):100-110.
- Téllez A, Cruz M, Mercado Y, Asaff A y Arana A. 2009. Mecanismo de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*, 30:73-80.

- Toledo A, Simurro M y Balatti P. 2013. Morphological and molecular characterization of a fungus, *Hirsutella* sp., isolated from planthoppers and psocids in Argentina. *Journal of Insect Science*, 13:1-12.
- Tolun A, Altintas Z, y Artik N. 2016. Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum Arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. *Journal of Biotechnology*, 239:23-33.
- Torres E. 2009. Study of compatibility of the yeast *Pichia onychis* LV027 with excipients and characterization of formulated media. Pontifica Universidad Javeriana de Bogotá.
- Valero-Jiménez C A, Wieggers H, Zwaan B, Koenraadt C y A.L.van Kanc J. 2016. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 133:41-49.
- Vélez P, Posada F, Marín P, González M, Osorio E y Bustillo Á. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Caldas-Colombia. CANICAFÉ, Boletín Técnico 37. <https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/709>
- Viera W, Noboa M, Bermeo J, Báez F, Jackson T. 2018. Parámetros de calidad de cuatro tipos de formulaciones a base de *Trichoderma asperellum* y *Purpuricillium lilacinum*. *Enfoque UTE*, 9(4):145-153.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

Rosa Ángela Flores Villarreal

Candidato para el Grado en

Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología

**Tesis:** FORMULACIÓN Y VIDA DE ANAQUEL DE CONIDIOS DE *Hirsutella citriformis* Speare PARA EL BIOCONTROL DE *Diaphorina citri* Kuwayama Y *Bactericera cockerelli* Sulc.

**Campo de Estudio:** Control Biológico

**Datos Personales:** Nacida en San Nicolas de los Garza, Nuevo León el 2 de Noviembre de 1995, hija de Irma Guadalupe Villarreal Reyna y Enrique Ricardo Flores Saldaña.

**Educación:** Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciatura en Biotecnología Genómica en 2018.

**Experiencia Profesional:** Del año 2018 a 2019 realizó actividades como profesional no docente en la Unidad de Formulación de Biológicos, dentro del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB), Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).