

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**



**Alternativas Sencillas en Medios de Cultivo Sólidos Alternativos para Hongos
Entomopatógenos de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae)**

Por:

ANA YELI REAL MOLINA

T e s i s

Presentada como requisito parcial para

obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Junio de 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Alternativas Sencillas en Medios de Cultivos Sólidos
para Hongos Entomopatógenos de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae)

Por:

ANA YELI REAL MOLINA

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

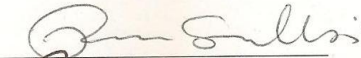
Aprobada



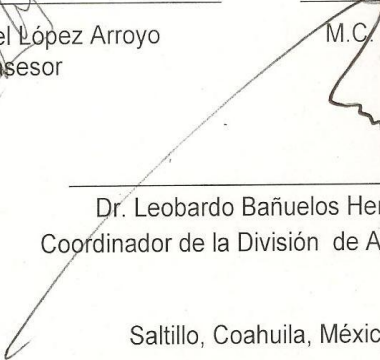
Dr. Sergio René Sánchez Peña
Asesor Principal



Dr. J. Isabel López Arroyo
Coasesor

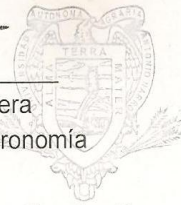


M.C. Rebeca Casique Valdés
Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México



Coordinación
División de Agronomía

Junio, 2012

Agradecimientos

A Dios Por darme la dicha de vivir, por iluminar mi camino, por todas y cada una de las cosas que hasta hoy me ha dado, además de su infinita bondad y amor por permitirme cumplir uno de los objetivos que me había trazado.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, porque me abrió las puertas, y me ha formado como profesionalista.

Al Dr. Sergio R. Sánchez Peña, por brindarme un poco de su valioso tiempo, paciencia por las asesorías, consejos, comentarios y correcciones acertadas de este trabajo y por ser un ejemplo a seguir.

A mis sinodales:

Al Dr. José Isabel López Arroyo, por el tiempo disponible para la revisión de este trabajo.

A mis Profesores del Departamento de Parasitología, A todos ustedes que con sus conocimientos me instruyeron en mi formación profesional y personal.

Al proyecto FONSEC SAGARPA-CONACYT número 2009-108591 por los fondos otorgados para la presente investigación.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Israel Real Jaímez

Ma. Isabel Molina Sánchez

A quienes me dieron la vida, a dos grandes personas a las cuales amo, quienes sin esperar nada a cambio, me dieron todo. A quienes me guiaron por un camino de rectitud. A un par de corazones buenos con gratitud eterna, por su gran corazón y capacidad de entrega, pero sobre todo por enseñarme a ser responsable, Por ustedes he logrado un objetivo más en mi vida.

A mis hermanos:

Angelita

Edith Beí

Leticia

Edgardo

Por la alegría que le dan a mi vida, Quienes me han regalado momentos inolvidables gracias por demostrarme su cariño en todo momento por su gran apoyo moral por eso y más muchas gracias los amo.

A cada uno de mis buenos amigos y amigas, por su valiosa amistad que nunca me ha faltado y con quienes he compartido momentos muy gratos. A los cuales llevare en el corazón.

Y por último dedico este trabajo tan importante e inolvidable; a mí misma, por no dejarme vencer y por mi fortaleza ya que en ocasiones el principal obstáculo se encuentra en uno mismo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	V
RESUMEN.....	VI
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	2
Objetivo general.....	2
Objetivos específicos.....	2
Hipótesis.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Hongos Entomopatógenos.....	3
Generalidades de los hongos entomopatógenos.....	3
Las principales ventajas de estos hongos.....	4
Desventajas.....	4
Mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos.....	5
Adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto.....	6
Penetración dentro del hemocele.....	6
Desarrollo del hongo que resulta en la muerte del insecto.....	7
Mecanismos de defensa de los insectos.....	8
Barreras físico-químicas.....	9
Sistema inmune innato.....	9
Otras estrategias de defensa.....	10
Asepsia.....	12
Lavado.....	12
Medios de Cultivo de Laboratorio.....	12
<i>Beauveria bassiana</i> (Bálsamo) Vuillemin.....	13
Caracterización taxonómica de <i>B. bassiana</i> tomado de NCBI taxonomy database.....	16
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin.....	17
Rango de hospedantes.....	19
Ciclo de vida de <i>Metarhizium anisopliae</i>	19
Descripción de <i>H. citriformis</i>	21
Hongo entomopatógeno, parasito obligado en forma natural.....	21
Hospederos de <i>H. citriformis</i>	21

Distribución geográfica	22
Taxonomía de <i>Hirsutella citrifomis</i> Speare	22
<i>Nomuraea rileyi</i> (Farlow) Samson	22
<i>Isaria fumosorosea</i>	23
Ubicación taxonómica de <i>Isaria fumosorosea</i>	24
Sporothrix (Torrubiella)	24
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Localización del experimento	26
Medios utilizados	26
Cultivo del hongo	27
Crecimiento radial en mm	28
Conteo de esporas	29
Colecta de esporas en los diferentes medios de cultivo	29
Procedimiento	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
Crecimiento radial de hongos entomopatógenos en diferentes medios de cultivo	32
Producción de esporas de hongos entomopatógenos en diferentes medios de cultivo	36
CONCLUSIONES	42
LITERATURA CITADA	43

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Pág.
Tabla1: Plagas que pueden ser controladas por <i>Beauveria bassiana</i>	17
Figura1: Mecanismo de infección de hongos entomopatógenos (Hyphomycetes)....	5
Figura 2: Esquema de la morfología de <i>Beauveria bassiana</i> (Bálsamo) Vuillemin, desde su micelio (I), cuerpo hifal (II) y conidias (III), Alvez 1986.....	15
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Beauveria bassiana</i> (Ferron, 1975).....	16
Figura 4: Insecto atacado por <i>M. anisopliae</i>	18
Figura 5: <i>Nomuraea rileyi</i> en PDA-L.....	23
Figura 6: <i>Isaria fumosorosea</i> en PDA-L.....	24
Figura 7: Medición del crecimiento radial del hongo.....	29
Figura 8: Cámara de Neubauer vista al microscopio (40X).....	30
Figura 9: Sector de la cámara de Neubauer que se debe contar.....	31
Figura 10: Crecimiento radial de <i>Beauveria bassiana</i>	32
Figura 11: Crecimiento radial de <i>Hirsutella citriformis</i>	33
Figura 12: Crecimiento radial de <i>Isaria fumosorosea</i>	34
Figura 13: Crecimiento radial de <i>Metarhizium anisopliae</i>	34
Figura 14: Crecimiento radial de <i>Nomuraea rileyi</i>	35
Figura 15: Crecimiento radial de <i>Sporothrix (Torrubiella)</i>	36
Figura 15: Producción de esporas en <i>Beauveria bassiana</i>	37
Figura 16: Producción de esporas en <i>Hirsutella citriformis</i>	37
Figura 17: Producción de esporas en <i>Isaria fumosorosea</i>	38
Figura 18: Producción de esporas en <i>Metarhizium anisopliae</i>	39
Figura 19: Producción de esporas <i>Nomuraea rileyi</i>	40
Figura 20: Producción de esporas <i>Sporothrix (Torrubiella)</i>	41

RESUMEN

En la presente tesis se evaluaron alternativas en ingredientes de medios de cultivo sólido para el desarrollo y manejo de cepas de hongos entomopatógenos del psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) (PAC). Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación FONSEC SAGARPA-CONACYT. Se evaluó el efecto de ingredientes alternativos de medios sólidos de cultivo en el desarrollo de hongos entomopatógenos mediante la determinación del crecimiento radial de 6 cepas diferentes de estudio en 5 medios de cultivos. Así como se determinó el efecto de ingredientes alternativos de medios sólidos de cultivo en la producción de esporas de hongos entomopatógenos mediante conteos para la obtención de número de conidias/mm² de medio de cultivo. El registro de la producción de esporas del hongo *Metarhizium anisopliae* se observó un monto de 9.125 esporas/3 cm² x 10E⁸ como máximo que correspondió al medio de cultivo con malta. *Beauveria bassiana* en el medio Agar Sabouraud (ASD) y PDA-L mostraron niveles altos de esporulación con 1.85 y 1.67 esporas/3 cm² x 10E⁸, respectivamente. En el caso de *Hirsutella citriformis* el medio con el ingrediente alternativo huevo mostró 3.75 esporas/3 cm² x 10E⁷ que prácticamente fue el doble de la observada en el resto de los medios evaluados. En *Isaria fumosorosea* fue mayor en los medios sólidos con los ingredientes alternativos huevo y frijol, con un registro de 3.99 y 3.46 esporas/3 cm² x 10E⁷, respectivamente. En *Sporothrix (Torrubiella)* malta produjo una esporulación abundante y notable con 16.61 esporas/3 cm² x 10E⁷.

Palabras clave: *Diaphorina citri*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Hirsutella citriformis*, *Isaria fumosorosea*, *Sporothrix (Torrubiella)*, Hongos entomopatógenos.

INTRODUCCIÓN

Existe gran interés en el uso de hongos entomopatógenos (Ascomycota) en el control del psílido Asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) (PAC) un insecto que se desarrolla exclusivamente en plantas de la familia Rutaceae, particularmente del género *Citrus*, y especialmente en *Murraya paniculata*, planta ornamental que es una de sus hospederas preferidas. Además del daño directo que causa al alimentarse, el insecto es el vector de una seria enfermedad llamada Greening o Enverdecimiento de los cítricos. Este nombre ha sido cambiado recientemente a Huanglongbing (Enfermedad del Dragón Amarillo), debido a que fue descubierta por primera vez en China (Cáceres *et al.*, 2002).

El PAC es un insecto muy pequeño, de 3 a 4 mm de longitud, cuyas características son las manchas pardas en las alas dejando un área central clara y la posición que adopta el adulto al posarse en la planta formando un ángulo de 45°. La hembra es capaz de llegar a depositar hasta 800 huevos durante su vida. Los huevos son de 0.3 mm de longitud, de amarillos a anaranjados y alargados, son depositados en las hojas de brotes muy tiernos. Presenta cinco instares ninfales de color anaranjado amarillento; el primer instar mide 0.25 mm de longitud y el último de 1.5 a 1.7 mm. El ciclo de vida dura entre 20 a 40 días, dependiendo de las condiciones climáticas y pueden llegar a tener más de 30 generaciones traslapadas por año. En la India los adultos pueden vivir 190 días en invierno, y sólo 20 días en verano. Las mayores densidades de población son en los meses secos, disminuyendo en los meses de mayor precipitación. Las características necesarias para el desarrollo del PAC son temperaturas altas, más de 30° C, 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 (Mead *et al.*, 2007). El insecto fue detectado en México desde el año 2002 y actualmente se encuentra en todas las zonas citrícolas del país (Alarcón, 2009). La causa de la enfermedad HLB es por la transmisión de la bacteria vascular llamada *Candidatus Liberibacter spp.*, que se desarrolla en el floema de los cítricos. A causa de la enfermedad millones de árboles han sido eliminados en países asiáticos, africanos y algunos americanos (Brasil y Estados Unidos). Los árboles de naranja,

mandarina, toronja y limón pueden morir en un periodo de 3 a 8 años, sin que a la fecha exista cura para esta enfermedad (SAGARPA, 2010).

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar alternativas en ingredientes de medios de cultivo sólido para el desarrollo y manejo de cepas de hongos entomopatógenos del psílido asiático de los cítricos en laboratorio.

Objetivos específicos

- 1 Evaluar el efecto de ingredientes alternativos de medios sólidos de cultivo en el desarrollo de hongos entomopatógenos mediante la determinación del crecimiento radial de las diferentes cepas de estudio.
- 2 Determinar el efecto de ingredientes alternativos de medios sólidos de cultivo en la producción de esporas de hongos entomopatógenos del psílido asiático de los cítricos.

Hipótesis

La utilización de medios alternativos sólidos para el cultivo de hongos entomopatógenos puede favorecer su desarrollo y reproducción, y además disminuir costos de producción.

REVISIÓN DE LITERATURA

Hongos Entomopatógenos

Estos hongos se han aislado y determinado causando epizootias en diferentes partes del mundo, *Hirsutella citriformis* Speare, *Isaria fumosorosea* Wize (Ifr) (*Paecilomyces fumosoroseus*), *Beauveria bassiana* y *Metarrizhium* (González et al., 2001., Cabrera et al., 2001, Meyer et al., 2007, Senasa, 2010).

El control biológico mediante el uso de hongos entomopatógenos representa una alternativa dentro de las estrategias de manejo, por una diversidad de especies de hongos, entre los cuales los más importantes dentro de los hyphomycetes se incluyen a *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown y Smith, *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Gams & Zare y *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (Bucher, 1964; Feng et al., 1990; Sánchez-Peña, 1993; Yokomi, 1994).

Generalidades de los Hongos Entomopatógenos

Uno de los factores que limita la producción de los cultivos son las plagas agrícolas. El uso indiscriminado de insecticidas orgánicos sintéticos ha traído como consecuencia la selección de individuos resistentes, la resurgencia de nuevas plagas, la contaminación ambiental y riesgos a la salud humana y animal. Estos factores han hecho posible el surgimiento de sistemas nuevos de producción agrícola, como la producción orgánica; han creado la necesidad de obtener productos inofensivos para otros organismos no perjudiciales (entomófagos) y han obligado a legislar más estrictamente sobre la presencia de residuos en los productos agropecuarios.

Ciertos hongos poseen características muy especiales que les permiten sobrevivir en forma parasítica sobre los insectos y en forma saprofita sobre material vegetal en descomposición. El crecimiento saprofita puede dar como resultado la producción de conidióforos, conidias y desarrollo miceliano. Esta característica permite que el hongo pueda ser cultivado en el laboratorio utilizando técnicas de producción en masa de bajo costo. Los hongos tienen un gran potencial para ser empleados como biocontroladores. Entre los principales hongos que presentan estas características están: *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* (Ferron *et al.*, 1978).

Las principales ventajas de estos hongos:

1. Presentan grados variables de especificidad, pueden ser específicos a nivel de familia o especies muy relacionadas. En el caso de las cepas, pueden ser específicas a nivel de especie, sin afectar a los enemigos naturales.
2. Si el entomopatógeno encuentra las condiciones adecuadas para introducirse y colonizar un ecosistema, se reproduce y renueva en forma continua, es decir, se vuelve persistente, haciendo innecesarias nuevas aplicaciones.
3. Se pueden aplicar mezclas de hongos entomopatógenos con dosis sub letales de insecticidas para lograr efectos sinérgicos superiores a los logrados con aplicaciones de cada producto por separado.
4. No contaminan el medio ambiente ni afectan al hombre u otros animales superiores.
5. Cuando el hongo no llega a causar la muerte directamente, se presentan efectos secundarios que alteran el normal desarrollo del ciclo de vida del insecto.

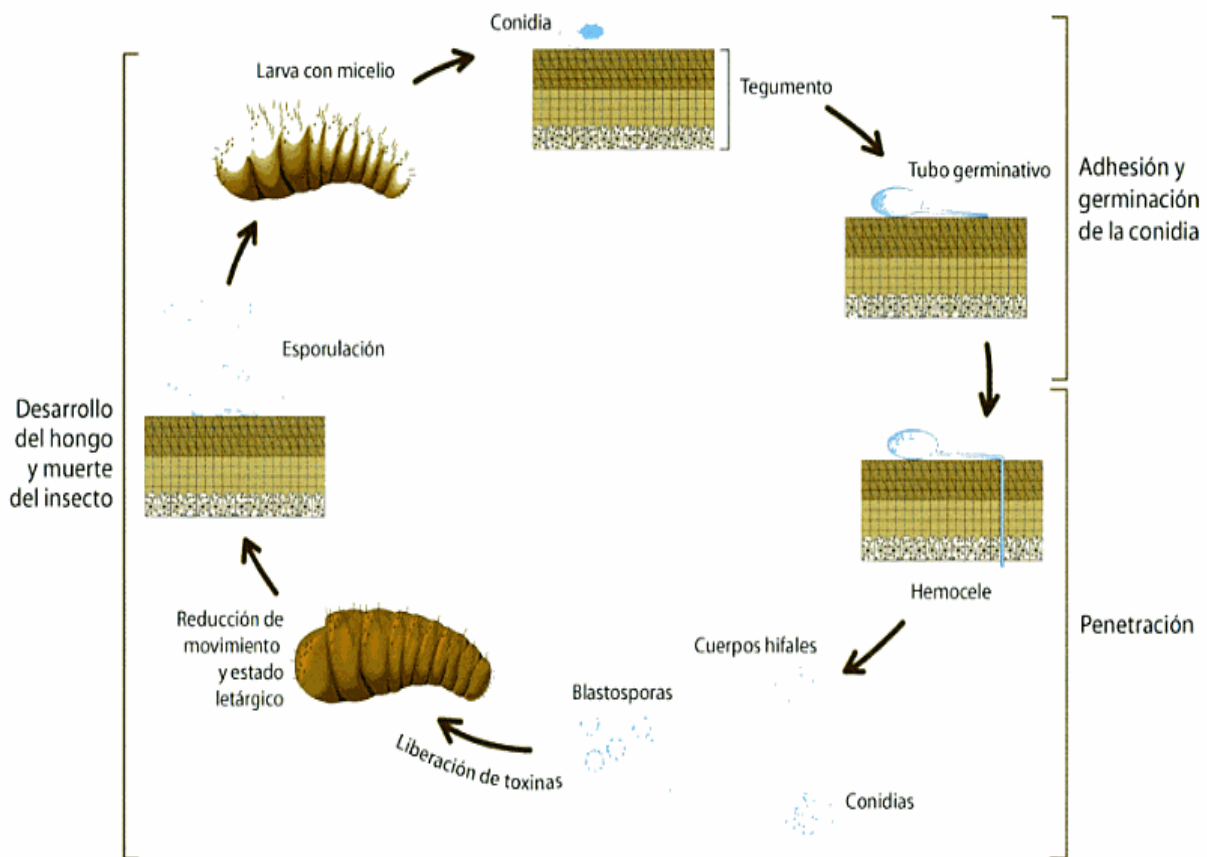
Desventaja

1. Sensibilidad a la variación de las condiciones climáticas como temperaturas extremas, desecación y luz ultravioleta. Estas limitantes están siendo contrarrestadas mediante el uso de aditivos (protectores solares, aceites, antidesecantes).

2. Requieren de condiciones de almacenamiento más exigentes que las moléculas inorgánicas, para evitar que pierdan su patogenicidad.
3. En general, los insecticidas biológicos no matan instantáneamente. Alcanzan buenos niveles de control entre una y tres semanas después de la aplicación, dependiendo de la plaga y del ambiente. Sin embargo, el insecto deja de ser plaga al ser parasitado por el hongo, deja de alimentarse mucho antes de morir, disminuyendo el daño.

Mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos

La enfermedad producida por hongos se llama micosis. Tanada y Kaya (1993) mencionan que el desarrollo de la micosis puede ser separado en tres fases (Figura



1):

Figura 1:

Mecanismo de infección de hongos entomopatógenos (Hyphomycetes).

Adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto:

El proceso de adhesión, dependiendo del hongo, puede ser un fenómeno específico o no específico. Mientras que la germinación de las esporas es un proceso mediante el cual una espora emite uno o varios pequeños tubos germinativos que al

crecer y alargarse da origen a las hifas, este proceso depende de las condiciones de humedad y temperatura ambiental. En menor grado la luz condiciona el ambiente alimenticio. La espora que germina en el insecto forma un tubo germinativo el cual funciona como una hifa de penetración de la cutícula. También puede producir una estructura llamada apresorio, la cual ayuda a la adhesión de la espora. El éxito de la germinación y penetración no dependen necesariamente del porcentaje de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, modo de germinación, agresividad del hongo, tipo de espora y susceptibilidad del hospedante (Samson, *et al*, 1988).

Los hongos, además, pueden infectar a los insectos a través de las aberturas corporales como son cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas. Las esporas pueden germinar rápidamente en estos ambientes por ser húmedos. Cuando lo hacen en los fluidos digestivos, pueden destruir a la hifa germinativa. En este caso, el insecto no muere de micosis sino a causa de las toxinas.

Penetración dentro del hemocele

Esta penetración por parte de la hifa es el resultado de la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica ejercida por el tubo germinativo. Además, depende de las propiedades de la cutícula, grosor, esclerotización, presencia de sustancias nutricionales y antifungosas (Charnley, 1984) y estado de desarrollo del insecto. La digestión del integumento se produce mediante las enzimas (proteasas, aminopeptidasas, lipasas, esterases y quitinasas). Cuando la hifa ha llegado al hemocele, se pueden producir diferentes reacciones de defensa del insecto frente a un cuerpo extraño: la fagocitosis, encapsulación celular y la formación de compuestos antimicrobianos como las lisozimas, aglutininas y melanización. En este caso, el hongo debe vencer el sistema inmunológico del hospedante antes de entrar a la hemolinfa y desarrollarse dentro del insecto.

Desarrollo del hongo que resulta en la muerte del insecto

Luego de que llegue al hemocele, el hongo puede evitar la defensa inmune del insecto produciendo células parecidas a levaduras, llamadas blastosporas, que se multiplican y dispersan rápidamente, desarrollando protoplastos, elementos discretos ameboides, sin pared celular que no son reconocidos por los hemocitos del hospedante (Pérez, 2004) y produciendo micotoxinas (Tanada y Kaya, 1993). La dispersión de éstos en el hemocele depende de la especie del hongo.

Las toxinas producidas juegan un rol muy importante en el modo de acción de los hongos entomopatógenos. La muerte del insecto se produce con mayor rapidez cuando es afectado por un hongo entomopatógeno que produce cantidades considerables de toxinas, ya que se adiciona la toxemia a la destrucción de los tejidos y a las deficiencias nutricionales.

A continuación del crecimiento del hongo en el hemocele, se producen los síntomas fisiológicos del insecto afectado como convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos alterados (deja de alimentarse, reduce su movimiento), entra en un estado letárgico y finalmente muere, lo que puede ocurrir relativamente rápido o en unos cuantos días. Ocurre una competencia entre el hongo y la flora intestinal. Los hongos pueden producir sustancias antibacterianas que alteran la coloración del cadáver (Ferrón, 1978).

Con la muerte del insecto termina el desarrollo parasítico del hongo y empieza la fase saprofítica: el hongo crece en el hemocele formando masas micelianas que salen al exterior fundamentalmente por las regiones intersegmentales –esporulando sobre el cadáver y produciendo inóculo para infectar a otros insectos– y por las aberturas naturales (espiráculos, boca y ano). La gran dependencia de la humedad es el mayor factor limitante que presentan los hongos, ya que para que se produzca la germinación y esporulación fuera del hospedante se requieren valores de humedad relativa superiores a 90%.

Mecanismos de defensa de los insectos

En general, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* ha sido el organismo modelo utilizado para dilucidar los mecanismos de defensa de los insectos ante el ataque de los patógenos, los cuales han sido clasificados en 1) barreras físico-químicas y 2) sistema inmune innato (Meister *et al.*, 1997; Elrod-Erickson *et al.*, 2000; Levitin y Whiteway, 2008) y 3) otras estrategias de defensa. En el caso de insectos sociales, como abejas, termitas y hormigas también se ha observado que adaptaciones de su comportamiento permiten mantener la inmunidad de sus colonias (Richards *et al.*, 2008).

Barreras físico-químicas

La cutícula es la primera línea de defensa al ser una estructura rígida que recubre la parte externa del insecto conformada por dos capas: la epicutícula y la procutícula. La primera está compuesta principalmente por grasas, ceras y lipoproteínas, cuya función es evitar la pérdida de agua por la transpiración. La segunda es la más abundante ya que constituye el 95% de esta estructura y está compuesta de quitina y diversas proteínas estructurales que proporcionan rigidez, actuando como una barrera física a la penetración de los patógenos, además de ser difícilmente degradada por las enzimas líticas excretadas por los mismos (Hajek y St. Leger, 1994).

En la actualidad se considera que la cutícula tiene una función más activa, ya que desde la epidermis se secretan moléculas que actúan de manera específica inhibiendo los mecanismos de infección de los entomopatógenos. Se ha reportado que en la cutícula se da la producción de proteasas, peptidasas antifúngicas e inhibidores de proteasas fúngicas que podrían tener un papel importante durante la infección, además de la presencia de ácidos grasos de cadena corta y lípidos de cutícula que inhiben la germinación de las esporas de los hongos (Dunn, 1991; Samuels y Paterson, 1995; Kachatourians, 1996; James *et al.*, 2003).

Sistema inmune innato

La segunda línea de defensa de los insectos la constituye el sistema inmune innato conformado por el sistema celular y el sistema humoral, capaz de reaccionar ante la invasión de patógenos diferenciando lo propio de lo extraño. En este proceso participan los sistemas de reconocimiento de patrones moleculares característicos de polisacáridos microbianos presentes en la pared celular como: peptidoglicanos, abundantes en bacterias Gram (+); liposacáridos en la membrana externa de bacterias Gram (-) y finalmente β -1,3 glucanos en la pared celular de los hongos.

El sistema humoral utiliza proteínas antibióticas y otras moléculas efectoras que circulan en el hemocele y/o cutícula con la finalidad de inactivar los agentes patógenos que accedan al interior del insecto. Se ha descrito que los insectos sintetizan moléculas con acción biocida específica tales como cecropinas, defensinas, atacinas, lisozimas, entre otros. (Boman *et al.*, 1991). Aunque es un tema aún controvertido, se ha determinado la existencia de fenoloxidasas y hemaglutininas (lectinas) en la hemolinfa que podrían simular el papel de antígenos en combinación con proteínas depositadas en la superficie de los invasores. En algunos dípteros, el plasma de la hemolinfa se encarga de melanizar y encapsular los microorganismos invasores vía tirosina-fenoloxidasa sin que los hemocitos estén involucrados en la formación de la cápsula (Tanada y Kaya, 1993).

El sistema celular, por su parte, está compuesto por los hemocitos que circulan por el hemocele capaces de reconocer los elementos extraños mediante receptores tipo Toll que activan la producción de varios péptidos antimicrobianos (Levitin y Whiteway, 2008). Cuando la concentración de microorganismos patógenos es baja, la fagocitosis es el principal mecanismo para eliminar a los invasores. A concentraciones mayores, se forman agregados denominados nódulos. Existen evidencias que indican que las proPO (pro-fenoloxidasas) juegan un papel muy importante en este sistema, las cuales son enzimas clave para la síntesis de melanina, polímero que suele depositarse sobre los patógenos, formando los encapsulados (Marmaras *et al.*, 1996). En *Drosophila*, dicha reacción es regulada mediante una cascada de señales que involucra serin proteasas

inducibles (MP1 y MP2) y su inhibidor (serpin Spn27A), las primeras actúan como activadores de la fenoloxidasa y el segundo regula la actividad enzimática. MP1 activa la melanización en respuesta a infecciones provocadas, por hongos y bacterias, mientras que MP2 está principalmente involucrada en la respuesta a infecciones de origen fúngico (Tang *et al.*, 2006).

Aunque se han clonado los genes que codifican para las fenoloxidasas de *Sarcophaga bullata* y *Apis mellifera* (Chase *et al.*, 2000; Lourenco *et al.*, 2005), el estudio de estas enzimas aún es limitado; sin embargo, el interés por dilucidar el papel de estas enzimas durante la respuesta inmune en los insectos ha cobrado importancia en los últimos años (Kan *et al.*, 2008).

Otras estrategias de defensa

Como parte de la constante lucha por la supervivencia, algunos insectos son capaces de mejorar sus habilidades de defensa contra patógenos de acuerdo a la densidad de sus poblaciones. Bajo tales circunstancias, la selección natural favorece a aquellos individuos que usan señales asociadas a la densidad de población para desarrollar mecanismos de defensa óptimos. Como consecuencia, los individuos que crecen hacinados son más resistentes que aquellos que se desarrollan en condiciones de baja densidad. Este fenómeno denominado "profilaxis dependiente de la densidad" (Wilson y Reeson, 1998), se da principalmente en insectos que presentan polifenismo, como la langosta del desierto *Schistocerca gregaria*. Se observó que cuando estos insectos se desarrollan en condiciones de hacinamiento son significativamente más resistentes al hongo *Metarhizium anisopliae* que langostas solitarias, debido a una actividad antimicrobiana potenciada en sus sistemas de defensa (Wilson *et al.*, 2002).

Los insectos también son capaces de modificar su comportamiento con el propósito de luchar contra los agentes patógenos, tal es el caso de la langosta *Locusta migratoria* que al ser infectada por *Metarhizium anisopliae* incrementa su temperatura corporal por exposición al sol deteniendo el desarrollo de las blastosporas del hongo y

facilitando la acción de los hemocitos de su sistema inmune (Ouedraogo *et al.*, 2003., Téllez-Jurado *et al.*, 2009).

En el caso de los insectos sociales, éstos han desarrollado múltiples adaptaciones de conducta o comportamiento para evitar o combatir las infecciones por parásitos y patógenos. El primer caso de adaptaciones del comportamiento social consiste en remover a los miembros de la colonia con signos de enfermedad (Richard *et al.*, 2008). En el caso particular de las abejas, además de reconocer y remover a individuos enfermos, son capaces de producir una "fiebre social", donde las obreras se aglomeran e incrementan la temperatura en torno a larvas enfermas con el propósito de eliminar a los patógenos (Starcks *et al.*, 2000). Una segunda modificación del comportamiento se produce en los propios individuos enfermos para reducir la transmisión de la enfermedad, manteniéndose fuera de los nidos o alejados de las larvas o de la reina. Finalmente, una tercera modificación del comportamiento consiste en una interacción social alterada de grupos de individuos sanos con individuos infectados. El incremento del contacto de individuos sanos con los enfermos puede resultar en una "vacunación" colectiva de los individuos sanos, incrementando su inmunidad (Richards *et al.*, 2008).

La utilización de los hongos entomopatógenos en la agricultura ha ido en aumento en los últimos años debido al gran potencial que tienen en el manejo de plagas, representando una alternativa eficiente al uso de insecticidas químicos, considerados altamente nocivos para la salud del hombre y los ecosistemas. El entendimiento de los mecanismos involucrados durante el proceso de infección y la utilización de las nuevas técnicas de ingeniería genética permitirán la obtención de nuevos productos biológicos efectivos para su utilización en campo y la protección de especies benéficas de insectos.

Asepsia

Mantener el mayor cuidado en la limpieza del material y del laboratorio mismo es fundamental para realizar trabajos confiables. El medio ambiente se encuentra, por lo general, cargado de microorganismos diversos que pueden contaminar el

ámbito de trabajo, por ello es conveniente no descuidar la limpieza de los materiales, instrumentos y equipo necesario para el trabajo. Los materiales de vidrio y cualquier otro elemento deben estar profundamente limpios antes de comenzar el trabajo.

Lavado

Durante los trabajos con microorganismos, específicamente hongos, es necesario y fundamental trabajar con mucha asepsia, debido a que es indispensable el mantenimiento de los cultivos puros. Por lo tanto, es conveniente que luego de lavar todo el material de vidrio, éste sea enjuagado dos veces con agua destilada, para eliminar todo residuo de detergente antes de ser esterilizado.

Medios de cultivo de laboratorio

El medio de cultivo es una sustancia o solución que permite el desarrollo de microorganismos, mientras que el cultivo es el producto del crecimiento de un organismo. Los medios utilizados en micología deben contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo y reproducción de los hongos (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc.) y un pH ligeramente ácido (6 – 6.3) para facilitar su crecimiento e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos. Se puede añadir antibióticos antibacterianos para inhibir el crecimiento de bacterias saprofitas que suelen contaminar las muestras (Elósegui *et al.*, 2003).

Los medios pueden ser sólidos o líquidos. Para conseguir un medio sólido se debe agregar una sustancia solidificante como el agar (gelatina vegetal) o el agar agar (polisacáridos provenientes de algas), el cual no tiene valor nutritivo sino que sirve simplemente para mantener la humedad por un tiempo más o menos prolongado. La humedad es fundamental para el desarrollo de los hongos, porque

cuando ésta comienza a disminuir, la formación de micelio también disminuye y el hongo tiene que asegurar su existencia formando estructuras propagativas (esporas, conidias) y de conservación (clamidosporas). El agar empieza a derretirse a partir de 80 °C y soporta temperaturas altas sin descomponerse, solidificándose entre los 35 y 50 °C (Elósegui *et al.*, 2003).

***Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin:**

Colonias en PDA o MEA con aspecto aterciopelado a polvoriento, raras veces formando sinemas; blancas en los bordes que se vuelven amarillo-pálidas, algunas veces rojizas, incoloras al reverso, amarillas o rojizas. Conidióforos abundantes, que se levantan a partir de las hifas vegetativas sosteniendo grupos de células conidiógenas que se pueden ramificar para originar más células conidiógenas, globosas a forma de botella, con un raquis bien desarrollado Conidios hialinos, lisos, globosos a ligeramente elipsoidales, Clamidosporas ausentes. Difiere de *B. brongniartii* en que tiene las células conidiógenas más agrupadas y los conidios globosos (Elósegui *et al.*, 2003).

B. bassiana se ha mostrado que es eficiente en el control de hemípteros de las familias *Aphididae* (Humber, 1991) y *Aleyrodidae* (Salguero, 1993).

Beauveria bassiana, usada para el control de plagas de coleópteros, como los gorgojos que atacan a la batata (camote) y al plátano común; *Verticillium lecanii*, para controlar la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), un vector de enfermedades virales en tabaco, tomate, frijol y otros cultivos; *Metarhizium anisopliae*, para varias plagas de insectos; y *Trichoderma* spp, usado como antagonista de los patógenos del suelo en plántulas de tabaco. Entre los bioplaguicidas en proceso de desarrollo a gran escala están *Nomuraea rileyi* e *Hirsutella thonsomii* (Rosset and Moore, 1998).

Colonia: la colonia en PDA a los 14 días es algodonosa a polvorienta, blanca. A medida que va pasando el tiempo se vuelve amarillenta, cremosa. El revés es de color rojizo al centro y amarillento alrededor.

Células conidiógenas (c.cs.): están agrupadas formando grupos compactos grandes y a veces solitarias, en forma de botellitas de 3 a 6 x 3 a 5 μ . En ciertos casos, las c.cs. Se ramifican formando c.cs secundarias. Al final de las c.cs se forma un raquis que sostiene las conidias.

Raquis: hasta de 20 μ de longitud y 1 μ de diámetro, denticulado, que sostiene una conidia en cada dentícula.

El género se caracteriza por presentar un micelio blanco y microscópicamente presenta conidióforos sencillos, irregularmente agrupados o en grupos verticilados, en algunas especies hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene la conidia, la cual se presenta en forma de zig-zag, después de que varias conidias se producen; las conidias son hialinas, redondeadas a ovoides y unicelulares *B. bassiana* posee conidias de globosas a subglobosas (2-3 x 2.0-2.5 μ m) y las estructuras conidióforas forman densos grupos. Su crecimiento óptimo se da a temperatura de 25°C (Figura 2) (MacLeod, 1954; Hallsworth, 1999).

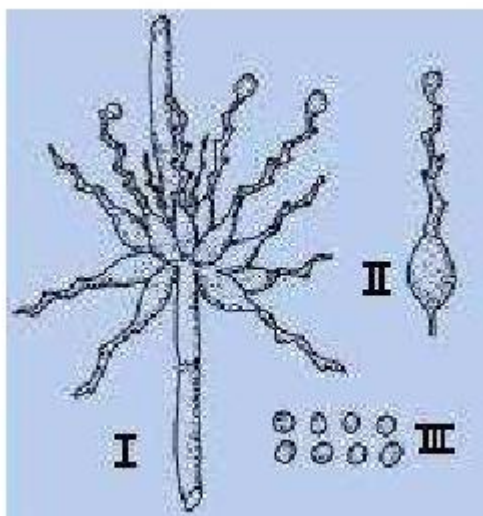


Figura 2: Esquema de la morfología de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, desde su micelio (I), cuerpo hifal (II) y conidias (III), Alvez 1986.

Por parte los hongos, desarrollan un mecanismo que tiende a frenar la reacción hemocítica, éste consiste en la producción de sustancias tóxicas o micotóxicas de diferente peso molecular, y ocasionan, inclusive, la muerte al insecto antes de que éste haya sido enteramente colonizado por el hongo (Kucera and Samsinakova, 1968), eventualmente coloreados por una pigmentación antibacteriana secretada por el hongo, como la oosporina, bassianina o tenellinas, por parte de *Beauveria*. Finalmente, el micelio emerge del tegumento y si la humedad ambiental es suficiente, esporula en la superficie del cadáver (Figura 3); si no, el hongo puede permanecer en forma dura y cesante hasta que se presentan las condiciones adecuadas para su esporulación y completar el ciclo de infección e iniciar otro (Ferron

1975).

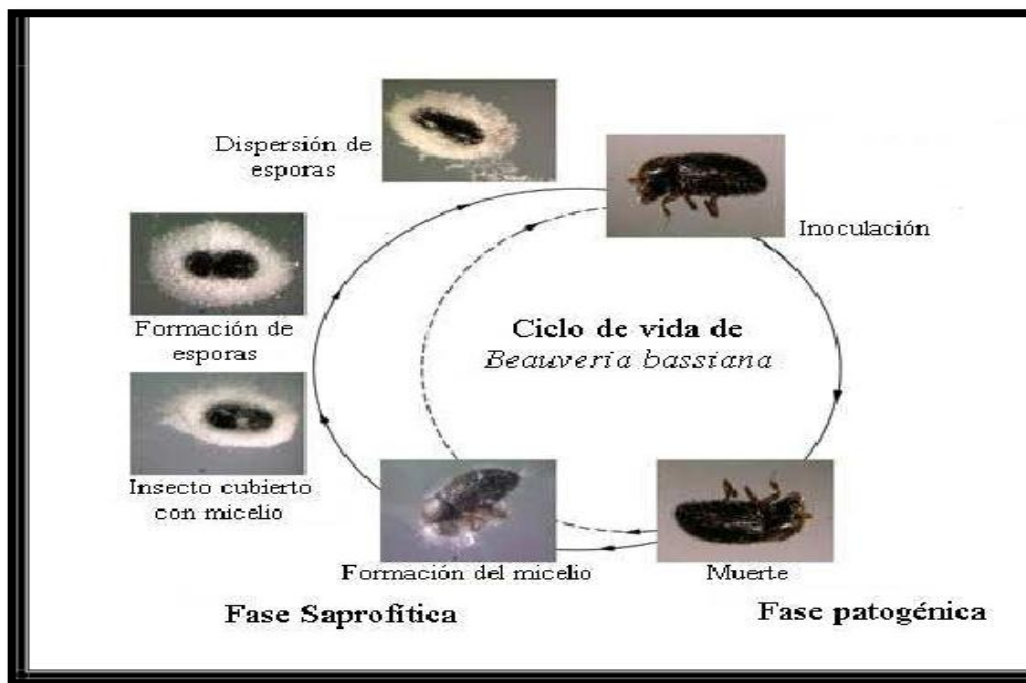


Figura 3.- Ciclo de vida de *Beauveria bassiana* (Ferron, 1975).

Caracterización taxonómica de *Beauveria bassiana* tomado de NCBI taxonomy database.

Reino: *Fungi*

Filum: *Ascomycota*

Supfilum: *Pezizomycotina*

Clase: *Sordariomycetes*

Subclase: *Hypocreomycetidae*

Orden: *Hypocreales*

Familia: *Clavicipitaceae*

Género: *Beauveria*

Especie: *B. bassiana*

Hoy en día *B. bassiana* es uno de los más importantes biocontroladores utilizados para el manejo de insectos que actúan como: vectores de enfermedades de humanos (*Anopheles albimanus*) (Scholte *et al*, 2004), plaga de cultivos (tabla 1) y plagas de importancia ecológica (termitas) (Holder & Keyhani, 2005).

Tabla 1- Plagas que pueden ser controladas por *Beauveria bassiana* (Wainwright, 1995).

Orden	Especie	Nombre común
Coleóptera	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Escarabajo colorado
Lepidóptera	<i>Cydia pomonella</i>	Polilla de los manzanos
Lepidóptera	<i>Ostrinia nubialis</i>	Perforador europeo del maíz
Orthoptera	<i>Turpilia opaca</i>	Saltamontes verde
Lepidóptera	<i>Lymantria dispar</i>	Oruga de los pinos
Lepidóptera	<i>Laspeyresia pomonella</i>	Plaga del manzano
Coleóptera	<i>Anthonomus grandis</i>	Picudo del algodón
Coleóptera	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Picudo negro del banano
Coleóptera	<i>Lissorhoptrus oryzophilus</i>	Gorgojo de agua
Coleóptera	<i>Euscepes postfasciatus</i>	Gorgojo del camote

***Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin.**

Colonias en PDA con un margen micelial blanco. Conidióforos con aspecto de "terrones" que se colorean con el desarrollo de las esporas. El color varía desde oliváceo hasta amarillo-verde o verde yerba oscuro. Pero en raros casos rosados o vináceos. Esporas formadas sobre hifas columnares, a veces discretos esporodoquios, como costras. Al reverso incoloras o color miel. Conidióforos abundantes, usualmente con 2-3 ramificaciones por nodo. Fiálides cilíndricas o clavadas que se adelgazan abruptamente hacia el ápice. Conidios en cadena formados en los ápices de las fiálides, estrechos, cilíndricos, delgados y truncados en ambos extremos, hialinos a oliváceos o verdes, lisos, aseptados. Las técnicas de biología molecular ha logrado una separación más allá de la clásicas variedades *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* y *Metarhizium anisopliae* var. *major*. Es el agente causal de las muscardinas verdes (Alves et al., 1989).

Previamente se ha mostrado que *M. anisopliae* es eficiente en controlar las poblaciones de hemípteros de las familias *Aphididae* (Hall, 1980) y *Cercopidae* (Arango et al., 1994; Toriello et al., 1999).

Colonia: pegada al medio, completamente redonda, de colores oliváceo, amarillento, verdoso, marrón oscuro, dependiendo del aislamiento. Revés incoloro a marrón, a veces verdoso citrino.

Conidióforo: nace del micelio y es irregularmente ramificado con dos a tres ramas en cada sepa. De 4 a 14 μ de longitud x 1.5 a 2.5 de diámetro.

Fiálides: cilíndricos en forma de clava, adelgazados en el ápice. Miden 6 a 13 μ de longitud y 2 a 4 μ de diámetro.

Conidias: unicelulares, cilíndricas y truncadas, formadas en cadenas muy largas, hialinas a verde oliváceo. Miden 3.5 a 9 μ de longitud x 1.5 a 3.5 μ de diámetro (Figura 4).



Figura 4: Insecto atacado por *M. anisopliae* (Cañedo V. 2004).

Rango de hospedantes

El rango de hospedantes sobre los que tienen efecto patogénico es dependiente de la especie y del aislado en cuestión. En general *Metarhizium* y *Beauveria* actúan sobre varios órdenes de insectos que agrupan varias especies de lepidópteros (*Mocis*, *Spodoptera*), coleópteros (*Cosmopolites*, *Pachnaeus*), ortópteros (*Locusta*, *Schistocerca*).

M. anisopliae ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diversos órdenes. Entre las plagas afectadas por este hongo se encuentra el salivazo de la caña de azúcar (*Aeneolamia varia*), y chinches plagas de diversos cultivos. Los insectos muertos por este hongo son cubiertos completamente por micelio, el cual inicialmente es de color blanco pero se torna verde cuando el hongo esporula (Sandino, 2003).

Ciclo de vida de *Metarhizium anisopliae*

En general los hongos entomopatógenos desarrollan las siguientes fases sobre su hospedante: germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción.

El proceso se inicia cuando la espora o conidia se adhiere a la cutícula del insecto, luego desarrolla un tubo germinativo y un apresorio, con éste se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto. La germinación ocurre aproximadamente a las 12 horas post-inoculación y la formación de apresorios se presenta de 12 a 18 horas post-inoculación (Vicentini y Magalhaes, 1996). En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración, lo que facilita el ingreso del hongo. Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizando completamente la cavidad del cuerpo del insecto, esto sucede en 3 ó 4 días después de la inoculación. A partir de la colonización se forman pequeñas colonias y estructuras del hongo, lo que corresponde a la fase final de la enfermedad del insecto, ocurre 4 ó 5 días después de la inoculación (Hajek y Leger, 1994).

Otra forma mediante la cual el hongo puede causar la muerte del insecto, es mediante la producción de toxinas. Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en el ciclo de la relación patógeno-hospedante. Entre estas toxinas se han encontrado dextruxinas, demetildextruxina y protodextruxina, las cuales son sustancias de baja toxicidad, pero de mucha actividad tóxica sobre insectos, ácaros y nematodos (Sandino, 2003). Las destruxinas afectan varios organelos tales como mitocondria, retículo endoplásmico y membrana nuclear, paralizando las células y causando disfunción del intestino, túbulos de Malpighi, hemocitos y tejido muscular. La esporulación ocurre en 2 a 3

días, dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad relativa del ambiente.

La infección por el entomopatógeno puede ser afectada principalmente por la baja humedad relativa y por la falta de habilidad para utilizar los nutrientes disponibles sobre la superficie de la cutícula ó por la falta de factores necesarios para el reconocimiento de un hospedero susceptible o sitio de infección penetrable. El reconocimiento de un hospedero susceptible involucra signos químicos y topograficos. También puede fracasar la invasión del hongo por la presencia de compuestos inhibitorios tales como fenoles, quinonas y lípidos en la superficie de la cutícula (Hajeck y Leger, 1994).

Los síntomas que causan los entomopatógenos son variables: las ninfas disminuyen sus movimientos, disminuyen la producción de espuma y pueden abandonar los lugares de ataque. Los adultos infectados presentan movimientos lentos, no se alimentan, reducen su radio de vuelo y las hembras no ovipositan. Pueden morir en lugares distantes de donde fueron contaminados. El ciclo total de la enfermedad es de 8 a 10 días. Después de la muerte, los individuos presentan un crecimiento micelial blanco seguido por la típica esporulación verde. En algunas ocasiones no se presenta la esporulación sobre el tegumento, solamente se ve la presencia de micelio y se debe a condiciones inadecuadas de humedad durante el proceso de esporulación (Lecuona, 1996).

Descripción de *Hirsutella citrifomis*.

Hongo entomopatógeno, parasito obligado en forma natural.

El micelio en el hospedero se observa de color café a gris, que cubre los cadáveres de los insectos y se une al sustrato donde se encuentre. Produce generalmente fructificaciones macroscópicas llamadas sinemas, formadas por haces compactos de hifas longitudinales.

Los sinemas son cilíndricos y pueden medir 12 mm de largo, con 0.2-0.3 mm de ancho, a veces simples, o con ramificaciones laterales cortas, compuestos por un

paquete compacto de hifas longitudinales, formando una capa compacta sobre la superficie. Las fíalides surgen como células laterales o a veces como células terminales en forma de ramas laterales cortas de las hifas, en la parte superior del sinema a veces se ve inflado, subglobuloso y elipsoide, pero más frecuentemente atenuado.

Hospederos de *H. citriformis*.

Se ha registrado en diferentes hospederos principalmente en adultos de Hemiptera: *Fulgoridae* en Nueva Zelanda, *Perkinsiella saccharicida* en Puerto Rico, *Ricania discalis* y *Siphanta acuta*, en Hawaii.

El hongo *H. citriformis* ha sido reportado infectando a *D. citri* alrededor del mundo tal como lo menciona Rivero-Aragón y Grillo Ravelo (2000). En Indonesia (Subandiyah *et al.*, 2000), Estados Unidos (Meyer *et al.*, 2007) en Cuba (González *et al.*, 2000, Cabrera *et al.*, 2001) y en México (Senasa, 2010, González *et al.*, 2008).

Distribución geográfica: África, Asia, América, Nueva Zelanda, Hawaii y las Islas Salomón.

Taxonomía de *Hirsutella citriformis* Speare.

Clase: *Ascomycota*

Subclase: *Hypocreomycetidae*

Orden: *Hypocreales*

Familia: *Clavicipitaceae*

Género: *Hirsutella*

Nombre científico: *Hirsutella citriformis* Speare 1920.

***Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson**

El hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* (Figura 5) Samson, es un candidato con potencial para ser utilizado como insecticida microbial para control de plagas lepidópteras (Ignoffo, 1981).

Colonias de lento crecimiento en PDA o Agar malta, afieltradas, con conidióforos muy complejos que se ramifican a intervalos regulares que se levantan erectos y muy densamente agrupados que dan lugar a conidios verde muy pálido que forman a veces costras, que con la edad cambian a tonalidades hasta verde malaquita. Hifas vegetativas lisas, hialinas. Los conidióforos son cortos y anchos, casi de la misma longitud el ancho y el largo. Fiálides cortas y redondas, cilíndricas a globosas con una base muy ancha. Conidios aseptados, catenulados, elípticos a cilíndricos. Parasitan larvas y pupas de lepidópteros y coleópteros (INISAV, 2006).

Nomuraea rileyi, un hongo que coloniza importante lepidópteros plagas en diversos cultivos. Con respecto a este patógeno, Ignoffo *et al.* (1975) estudió en los productos químicos in vitro de varios empleados en el cultivo de soja y observó que casi todos los fungicidas y algunos insecticidas y herbicidas probados inhibieron el crecimiento de hongos y la virulencia de hongos afectados.

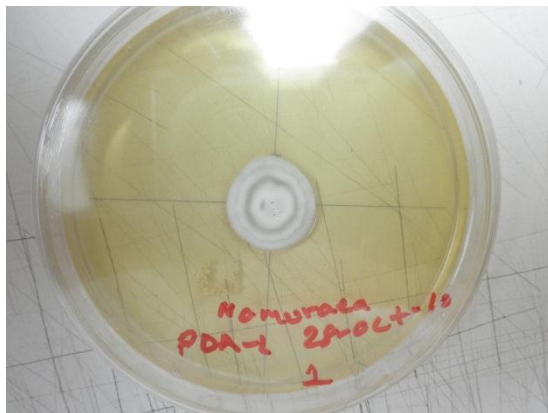


Figura 5. *Nomuraea rileyi* en PDA-L.

Isaria fumosorosea

El hongo *Isaria fumosorosea* (Wize) (figura 6) Brown y Smith (Deuteromycotina: *Hyphomycetes*) es un patógeno de amplio intervalo de hospederos y gran distribución geográfica, que ha sido aislado del suelo y de insectos de diversos órdenes como homópteros, coleópteros y colémbolos. (Lacey *et al.*, 1999).

Ubicación taxonómica de *Isaria fumosorosea* según Ulloa y Herrera (1994) es la siguiente:

Reino: *Fungi*

Filum: *Ascomycota*

Supfilum: *Pezizomycotina*

Clase: *Sordariomycetes*

Subclase: *Hypocreomycetidae*

Orden: *Hypocreales*

Familia: *Clavicipitaceae*

Género: *Isaria*

Especie: *Isaria fumosorosea*



Figura 6. *Isaria fumosorosea* en PDA-L.

Sporothrix (Torrubiella)

Torrubiella es un género de hongos patógenos de artrópodos que ataca principalmente a las arañas y los insectos de la escala. Sobre la base de la morfología de los peritecios, ascos y ascosporas, se clasifica en *Clavicipitaceae* s. lat. (Hypocreales), y es considerado un pariente cercano de *Cordyceps* s. 1., Que fue recientemente reclasificada en tres familias (*Clavicipitaceae* s. Str., *Cordycipitaceae*, *Ophiocordycipitaceae*) y cuatro géneros (*Cordyceps* s. Str, *Elaphocordyceps* y *Metacordyceps* y *Ophiocordyceps*). *Torrubiella* se distingue morfológicamente de *Cordyceps* s. lat. principalmente por la producción de peritecios superficial y la ausencia de un estroma estipitado bien desarrollada (Johnsona *et al.*, 2008).

Hongos imperfectos que desarrollan sinemas verticales, cilíndrico cónicos, con el ápice mazudo, de aspecto mucedináceo, casi completamente cubiertos en su totalidad de capítulos pedicelados insertos laterales. Las fructificación de cada cabezuela es semejante a la del género *Sterigmatocystis*. Los conidios son continuos y alargados (Gibellula *et al.*, 1894)

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del experimento

La presente investigación se realizó en el Departamento de Parasitología, en el Laboratorio de Control Biológico y el de Fitopatología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Buenavista a 7 Km al sur de la Ciudad de Saltillo, Coahuila.

Las cepas de hongos usadas se aislaron de *Diaphorina citri* de Tamaulipas y Veracruz (Casique Valdéz et al. 2011) a excepción de *Nomuraea rileyi* aislado de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* en Saltillo, y *Beauveria* y *Metarhizium*, de suelo en General Terán, NL.

Medios utilizados:

Agar con Extracto de Papa y Dextrosa deshidratado comercial (P.D.A): Agar con extracto de papa y dextrosa 39 gr marca Bioxon, levadura 10 gr, 1000 ml H₂O.

Es un medio muy usado que sirve para aislar todo tipo de hongos. *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium* (*Verticillium*) y *Metarhizium*, los más importantes hongos parásitos de insectos, al igual que los parásitos de plantas y los hongos saprofitos crecen muy bien y esporulan en este medio.

Agar Sabouraud Dextrosa deshidratado comercial (ASD) 65 gr marca Bioxon, 1000 ml H₂O.

Es un medio de cultivo muy utilizado para aislar hongos de animales. Sirve para el aislamiento y mantenimiento de hongos en tubo inclinado. Debido a su composición, los hongos crecen exuberantemente y esporulan bien. Es el medio estándar para observar la morfología típica de los hongos, pero no es el medio ideal de crecimiento o para estudiar la esporulación.

Agar con Extracto de Malta deshidratado comercial: Agar con extracto de malta, 48 gr marca Bioxon, 1000 ml H₂O.

Agar Yema de Huevo y Dextrosa: 3 yemas de huevo bien cocidas, licuados en 1000 ml H₂O, 20 gr de agar, dextrosa 20 gr.

Agar con Extracto de Frijol y Dextrosa: Agar 20 gr, Dextrosa 20 gr, extracto de frijol (200 gr) hervidos en 1000 ml H₂O. Lavar el frijol, hacer hervir en un litro de agua destilada por 20 minutos, colar y disolver en el líquido la dextrosa y el agar. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 120 °C.

Cultivo del hongo

A continuación se describe el procedimiento utilizado para la reproducción de este hongo.

1. Se pesaron los reactivos necesarios para preparar 1000 mL de medio. Poniéndolos en el matraz.
2. Con la probeta, se midieron 1000 mL de agua destilada y añadió al matraz con el polvo.
3. Se puso el matraz sobre el agitador con una mosca para que la suspensión se mezclara homogéneamente.

4. Cuando la solución se homogeneizó, se retiró del agitador, y saco el imán y tapo con un pedazo de aluminio.
5. La autoclave estará prendida previamente. Con cuidado se introduce el matraz en el interior de la autoclave. Se cierra siguiendo las indicaciones.
6. Una vez que empieza a salir vapor, se coloca la válvula en la autoclave, para que la presión comience a subir. Tiene que llegar hasta 120 °C. A partir de este momento, deberás tomar el tiempo de 15 minutos. Deberás tener cuidado de que la presión de la autoclave, nunca rebase los 120 °C, ni está por debajo. Esto se puede controlar conectando y desconectando la autoclave, según te indique.
7. Transcurridos los 15 minutos, desconecta la autoclave. Comienza a abrir la válvula para liberar el vapor y que la presión comience a bajar. La autoclave puede abrirse únicamente cuando el manómetro marque cero. ¡Antes no ya que podría explotar! (CIP, 2004).
8. La autoclave se abre desde atrás, procurando que nadie quede de frente hacia donde se abre la tapa, ya que saldrá mucho vapor caliente que causa quemaduras. Una vez que se abrió con cuidado, con ayuda del trapo, sacar el matraz.
9. Vaciar el medio en las cajas de Petri estériles siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la campana de flujo laminar. Las tapas no se sacan del área de esterilidad.
10. Ya sólidas, se cierran adecuadamente y se etiquetan con el tipo de medio, equipo, grupo y fecha de elaboración.
11. Vaciar el agua de la autoclave con cuidado de no quemarse.

Crecimiento radial en mm:

Los hongos se inocularon en el centro de las cajas Petri con los diferentes medios de cultivo, mediante explantes de 3mm tomados con un sacabocados de cultivos en PDA de los diferentes hongos. Se midió cada 2-4 días el crecimiento radial de los hongos inoculados en el centro de cajas Petri con medio. Esto fue

marcando una cruz al reverso de la caja marcando cada vez que se medía (figura 7). Para la medición se utilizó una regla.

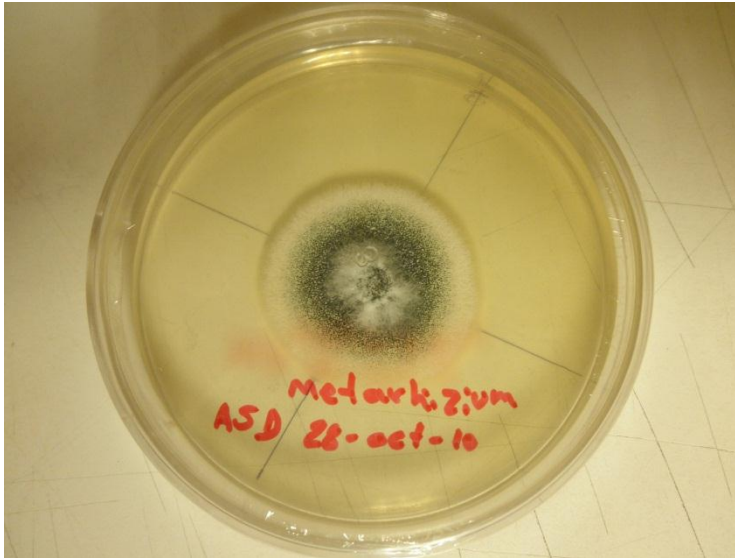


Figura 7. Medición del crecimiento radial del hongo.

Conteo de esporas

Colecta de esporas en los diferentes medios de cultivo

Para colectar las esporas (conidias) y determinar la producción de esporas en los medios de cultivo evaluados, se utilizó un sacabocados con lo cual se tomaron tres explantes al azar de cada caja Petri, teniendo 5 cajas por medio. Los explantes se colectaron al azar considerando que la esporulación generalmente es más intensa en el centro de la colonia. Una vez teniendo los 15 explantes de cada medio se colocaron en tubos en una solución de 40 mm de alcohol al 50% después de esto para determinar el número de esporas el conteo se realizó con una cámara de Neubauer bajo microscopio con una ampliación de 40 x.

El hematocímetro o cámara de Neubauer es una lámina de vidrio que tiene dos cámaras de 0.1 mm de profundidad. Cada cámara está dividida en nueve cuadrados de 1 mm². La superficie cubre un área total de 9 mm². Adicionalmente, el cuadrado del centro está subdividido en cinco por cinco cuadrados agrupados de 0.2 mm de lado y una superficie de 0.04 mm² cada uno. Los cuadrados del centro a su vez están subdivididos en 16 cuadrados más pequeños de 0.0025 mm² cada uno. Cinco de estos cuadrados se utilizan para el conteo de las conidias. Se debe dar especial atención al hecho de que la cámara se encuentra delimitada por tres líneas blancas entre los cuadrados. Esto es importante para definir cuáles son las conidias que se encuentran en el límite y que deben ser contadas. Generalmente se cuentan las conidias que están en la primera línea de arriba y de la derecha, no así las conidias que se encuentran en la línea de abajo y de la izquierda.

Procedimiento

1. Preparar una suspensión de conidias en agua destilada.
2. Con una pipeta Pasteur llenar la cámara con la suspensión de conidias y cubrirla con el cubreobjetos.
3. Observar al microscopio utilizando el aumento conveniente de acuerdo al tamaño de la estructura (40x es un aumento adecuado) (Figura 8).



Figura 8: Cámara de Neubauer vista al microscopio (40X).

4. Contar las conidias presentes en los cuadrados elegidos (generalmente se cuentan en los cuadrados de los cuatro ángulos y el centro, o en forma diagonal

empezando por el primero de la parte superior izquierda. También se deben contar las conidias que están ubicadas tocando la primera de las tres líneas que se encuentran circundando el cuadrado, las que se encuentran en la parte superior y la derecha del cuadrado. Se cuentan en total 10 cuadrados, cinco en cada cámara [cinco arriba y cinco abajo] (Figura 9).

5. Determinar el número de conidias por ml y el número total de conidias utilizando la siguiente fórmula: $\text{Conidias / ml} = \# \text{ de conidias contadas} \times 25,000 \times \text{factor de dilución}$
 $\text{Conidias total} = \text{conidias / ml} \times \text{Vol. de la suspensión original de conidias.}$

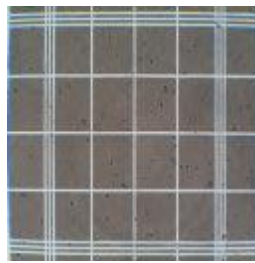


Figura 9: Sector de la cámara de Neubauer que se debe contar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general, los resultados obtenidos mostraron que tanto el crecimiento lineal como la producción de esporas en los medios de cultivo sólidos con extracto de frijol y huevo fueron comparables favorablemente a los medios convencionales en varios de los bioensayos efectuados.

Crecimiento radial de hongos entomopatógenos en diferentes medios de cultivo.

Se observó (Figura 10) un crecimiento radial en el medio de cultivo sólido con huevo presentó el mejor crecimiento, mostrando como mínimo al medio Agar Sabouraud (ASD), aunque los medios con malta y frijol también presentan buenos resultados.

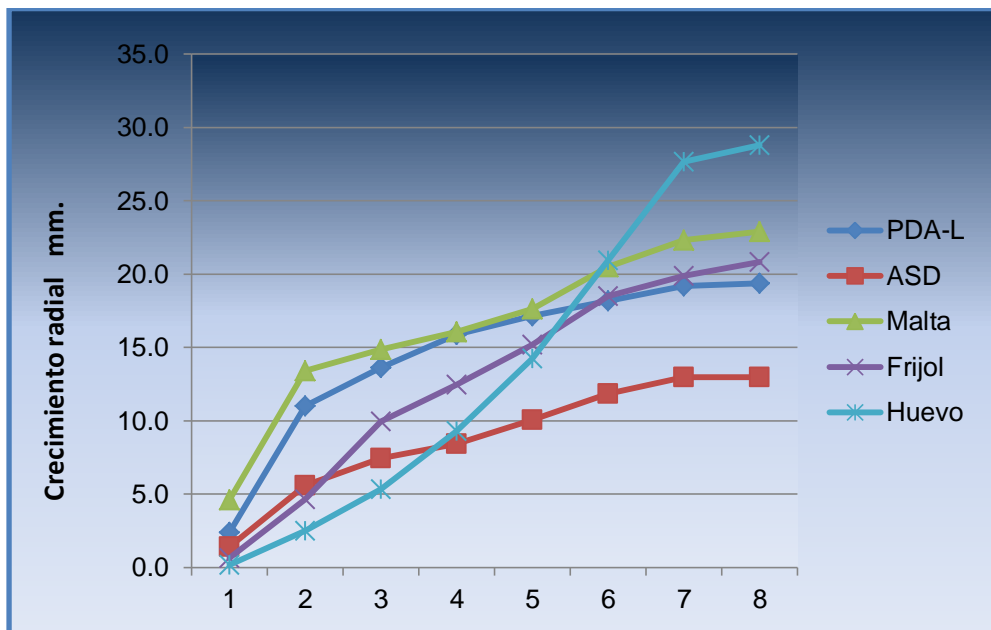


Figura 10. Crecimiento radial de *Beauveria bassiana* en diversos medios sólidos de cultivo. PDA= Agar Papa Dextrosa + Levadura; ASD= Agar Sabouraud; Frijol= Agar con extracto de frijol; Huevo= Agar con huevo cocido; Malta= Agar con extracto de malta; Eje x= fechas de medición; eje Y= mm.

En el caso del crecimiento radial de *H. citriformis* (figura 11), se observó un crecimiento máximo en Agar Sabouraud (ASD), un mínimo en PDA-L, mostrando el medio con huevo un buen desarrollo, muy cercano al observado con ASD.

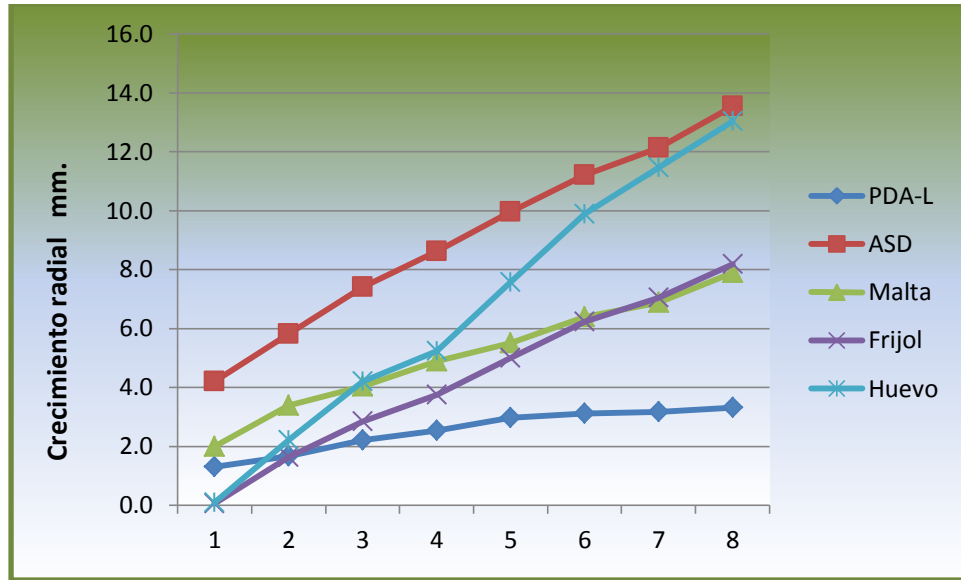


Figura 11. Crecimiento radial de *Hirsutella citriformis* en diversos medios sólidos de cultivo. PDA= Agar Papa Dextrosa + Levadura; ASD= Agar Sabouraud; Frijol= Agar con extracto de frijol; Huevo= Agar con huevo cocido; Malta= Agar con extracto de malta; Eje x= fechas de medición; eje Y= mm.

La fig. 12 muestra los resultados obtenidos del crecimiento radial de *I. fumosorosea*. Se observa cómo es que en malta se presentó el mayor crecimiento aunque PDA-L parece haber sido más estable; el medio con frijol parece ser una buena alternativa ya que también mostró un crecimiento radial notable. En el hongo *Metarhizium anisopliae* se obtuvo un crecimiento mayor en el medio Agar Sabouraud con resultados notables también en el medio con malta (Fig. 13).

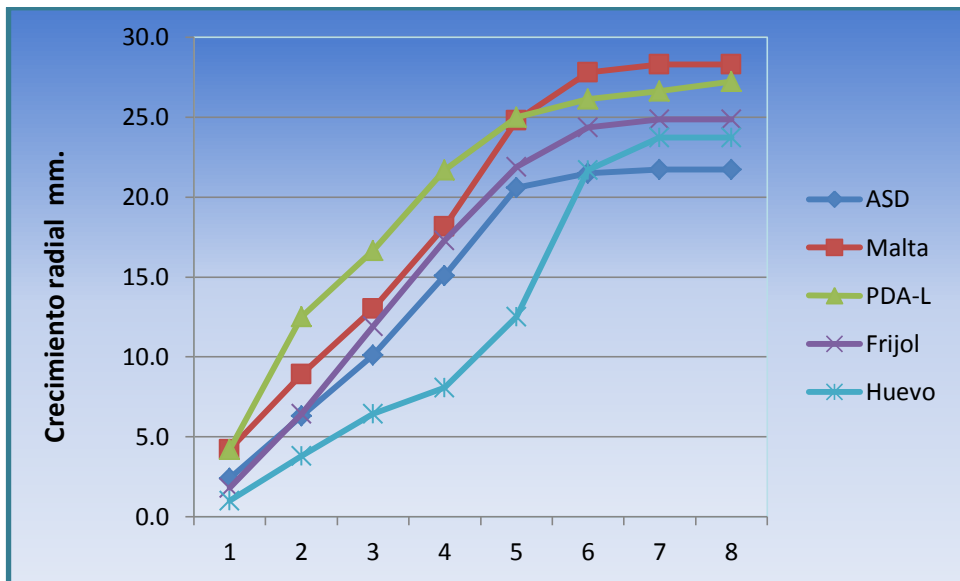


Figura 12. Crecimiento radial de *Isaria fumosorosea* en diversos medios sólidos de cultivo. PDA= Agar Papa Dextrosa + Levadura; ASD = Agar Sabouraud; Frijol= Agar con extracto de frijol; Huevo= Agar con huevo cocido; Malta= Agar con extracto de malta; Eje x= fechas de medición; eje Y= mm.

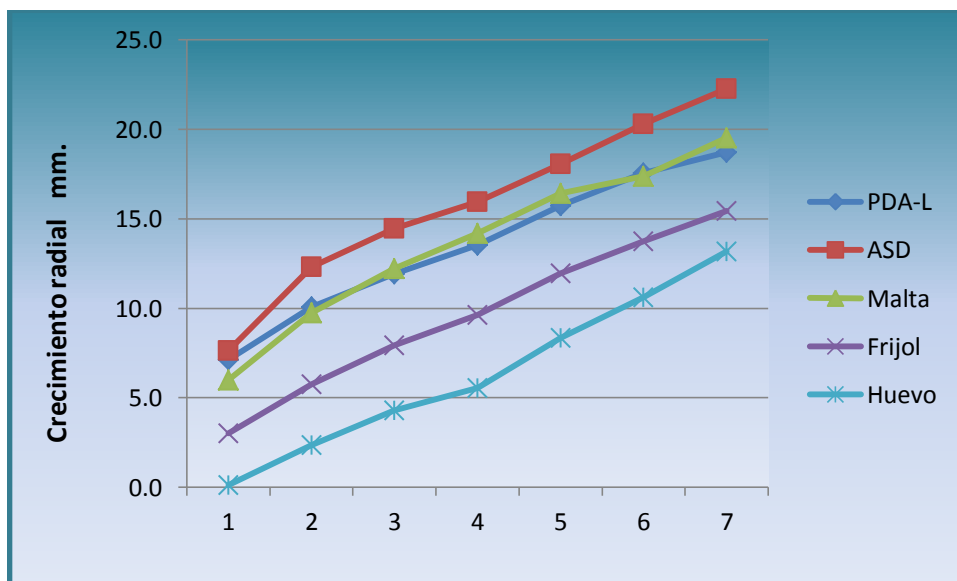


Figura 13. Crecimiento radial de *Metarhizium anisopliae* en diversos medios sólidos de cultivo. PDA= Agar Papa Dextrosa + Levadura; ASD= Agar Sabouraud; Frijol= Agar con extracto de frijol; Huevo= Agar con huevo cocido; Malta= Agar con extracto de malta; Eje x= fechas de medición; eje Y= mm.

El hongo *Nomuraea rileyi* presentó mayor crecimiento radial en el medio Agar Sabouraud y resultados notables en el medio con huevo, siendo el medio con frijol en

el que se registró el menor crecimiento del hongo (Figura 14). En el crecimiento radial de *Sporothrix (Torrubiella)* se observó que el medio con malta y PDA-L fueron los que mayormente lo favorecieron; no obstante, el medio con huevo presentó un crecimiento muy notable y similar al existente en el medio comercial Agar Sabouraud (Figura 15).

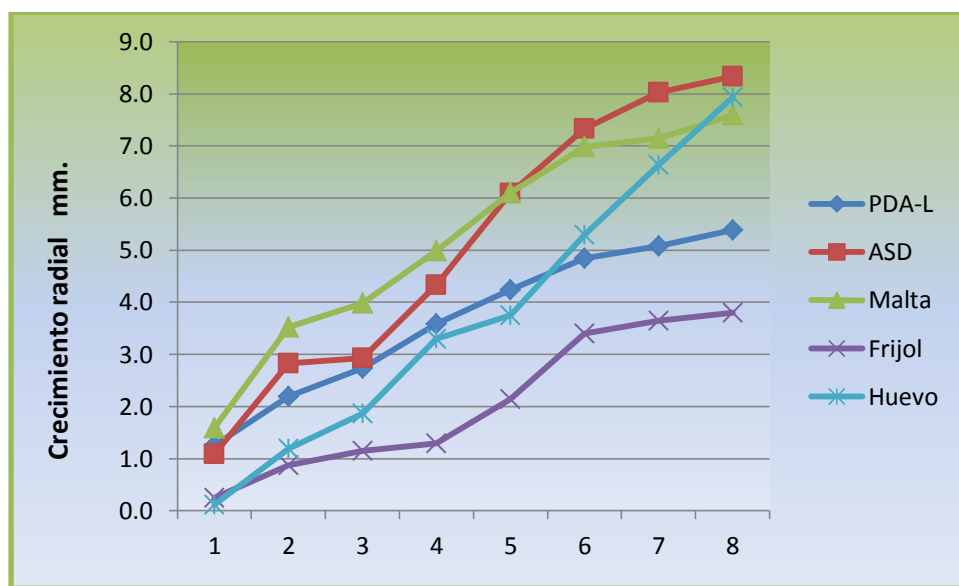


Figura 14. Crecimiento radial de *Nomuraea rileyi* en diversos medios sólidos de cultivo. PDA= Agar Papa Dextrosa + Levadura; ASD= Agar Sabouraud; Frijol= Agar con extracto de frijol; Huevo= Agar con huevo cocido; Malta= Agar con extracto de malta; Eje x= fechas de medición; eje Y= mm.

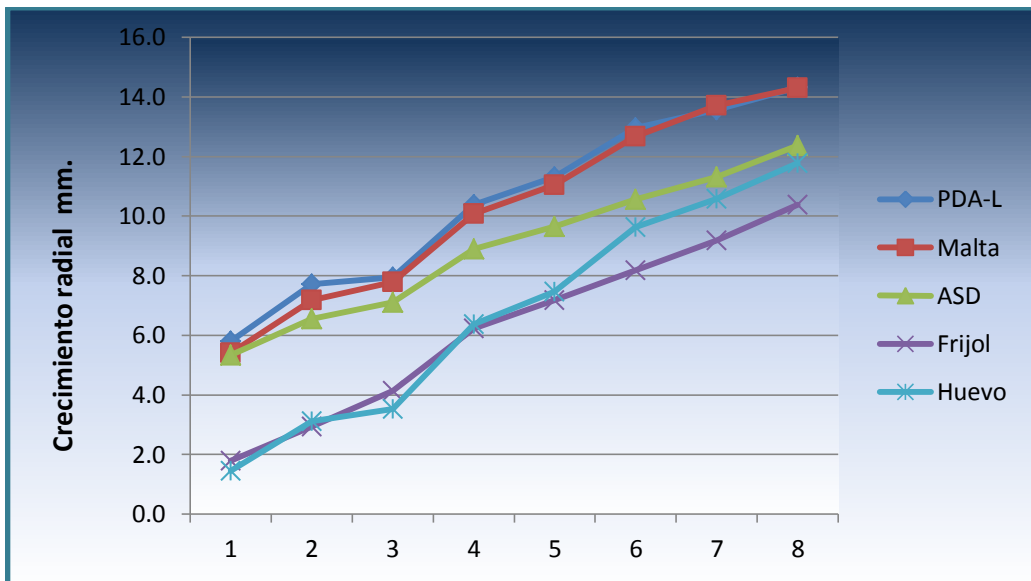


Figura 15. Crecimiento radial de *Sporothrix (Torribiella)* en diversos medios sólidos de cultivo. PDA= Agar Papa Dextrosa + Levadura; ASD= Agar Sabouraud; Frijol= Agar con extracto de frijol; Huevo= Agar con huevo cocido; Malta= Agar con extracto de malta; Eje x= fechas de medición; eje Y= mm.

Producción de esporas de hongos entomopatógenos en diferentes medios de cultivo.

En la figura 16 se presenta la esporulación *Beauveria bassiana* en los diversos medios de cultivo, donde es posible de apreciar que el medio Agar Sabouraud (ASD) y PDA-L mostraron niveles altos de esporulación con 1.85 y 1.67 esporas/ $3 \text{ cm}^2 \times 10^8$, respectivamente. De los medios con ingredientes alternativos sobresalió el preparado con huevo donde se obtuvo una producción de 1.58 esporas/ $3 \text{ cm}^2 \times 10^8$. Los registros menores de producción de esporas se obtuvieron con los medios con frijol o malta.

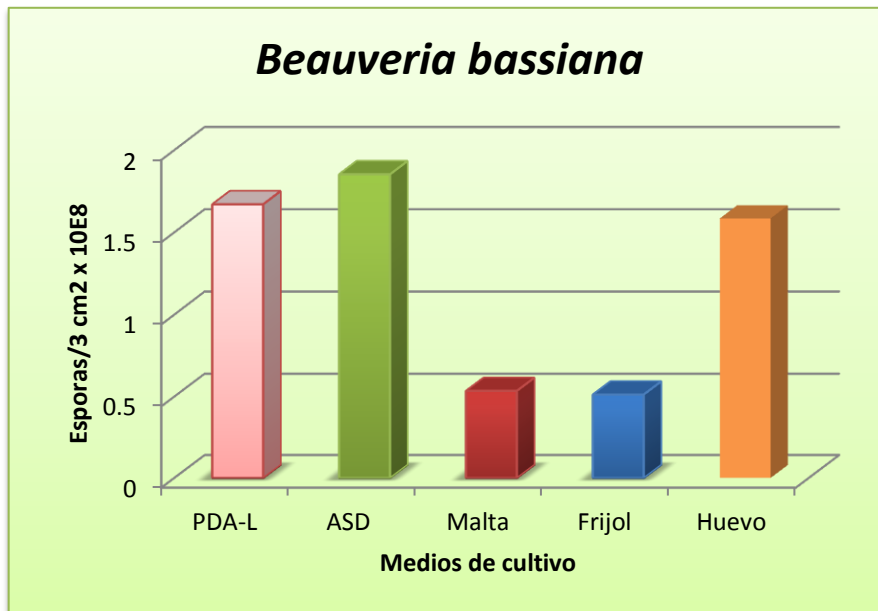


Figura 16. Producción de esporas en *Beauveria bassiana* en diversos medios de cultivo sólidos. PDA= Agar Papa Dextrosa + Levadura; ASD = Agar Sabouraud; Frijol= Agar con extracto de frijol; Huevo= Agar con huevo cocido; Malta= Agar con extracto de malta.

En el caso de *Hirsutella citrifomis* (Fig. 17), el medio sólido de cultivo con el ingrediente alternativo huevo mostró una notable esporulación con 3.75 esporas/3 cm² x 10E⁷ que prácticamente fue el doble de la observada en el resto de los medios evaluados. La menor esporulación ocurrió en el medio sólido PDA-L donde se registró un número de 0.95 esporas/3 cm² x 10E⁸.

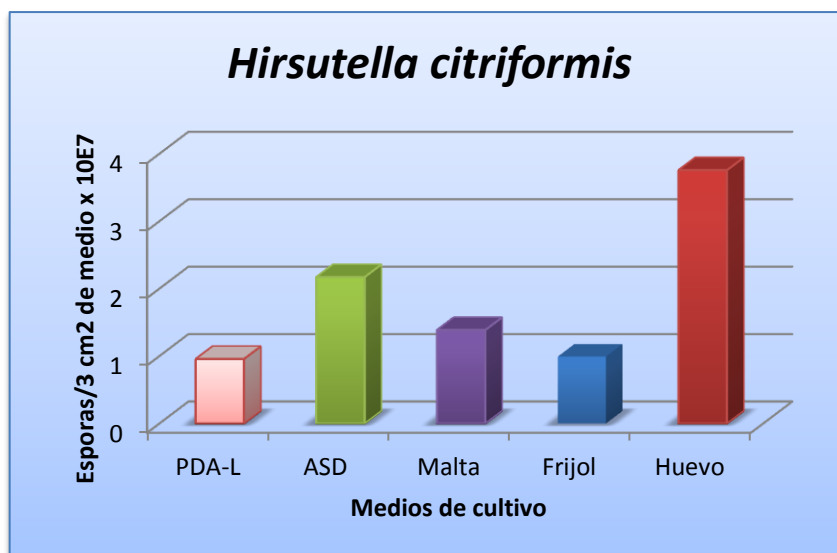


Figura 17. Producción de esporas en *Hirsutella citriformis* en diversos medios de cultivo sólidos. PDA= Agar Papa Dextrosa + Levadura; ASD = Agar Sabouraud; Frijol= Agar con extracto de frijol; Huevo= Agar con huevo cocido; Malta= Agar con extracto de malta.

La producción de esporas en *Isaria fumosorosea* (Fig. 18) fue mayor en los medios sólidos con los ingredientes alternativos huevo y frijol, con un registro de 3.99 y 3.46 esporas/3 cm² x 10E⁷, respectivamente. Los registros menores de esporulación fueron obtenidos en los medios sólidos con el ingrediente malta así como en el medio comercial Agar Sabouraud, donde la producción de esporas fue de 0.88 y 0.87 esporas/3 cm² x 10E⁷.

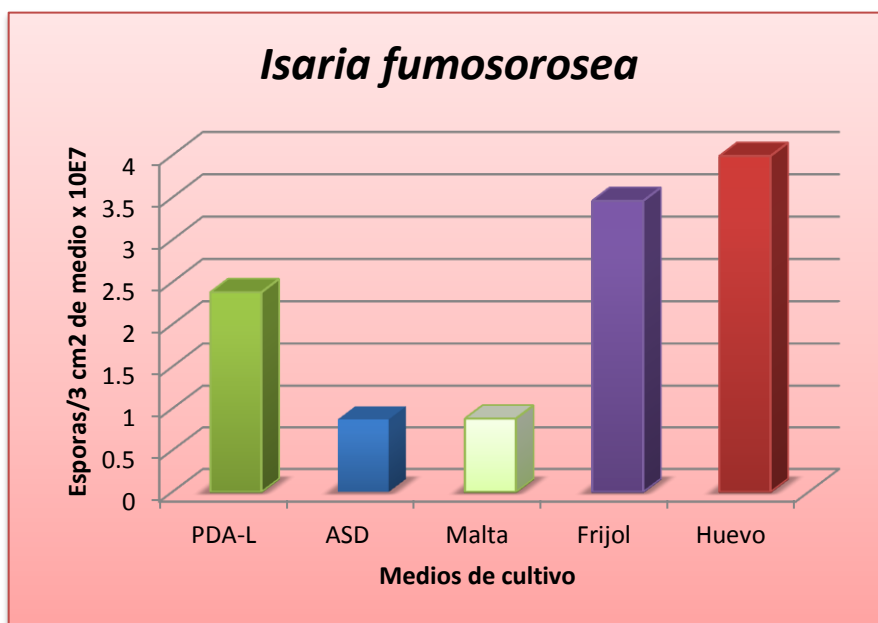


Figura 18. Producción de esporas *Isaria fumosorosea* en diversos medios de cultivo sólidos. PDA= Agar Papa Dextrosa + Levadura; ASD = Agar Sabouraud; Frijol= Agar con extracto de frijol; Huevo= Agar con huevo cocido; Malta= Agar con extracto de malta.

La fig. 19 Muestra los resultados obtenidos de la producción de esporas del hongo *Metarhizium anisopliae* en los diferentes medios de cultivos donde es posible observar un monto de 9.125 esporas/3 cm² x 10E⁸ como máximo y que correspondió al medio de cultivo con malta, el registro mínimo fue obtenido en el medio preparado con huevo, con 0.4 esporas/3 cm² x 10E⁸.

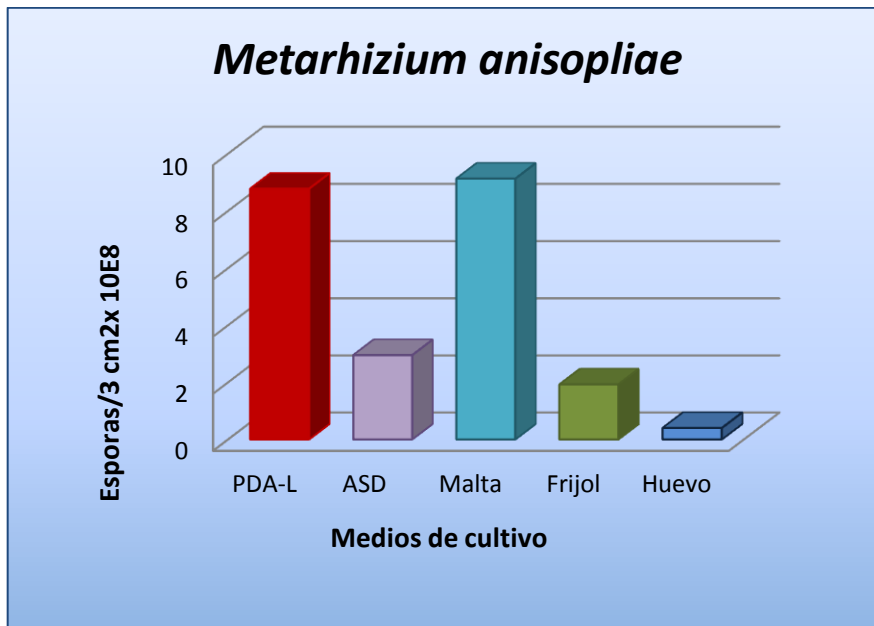


Figura 19. Producción de esporas en *Metarhizium anisopliae* en diversos medios de cultivo sólidos. PDA= Agar Papa Dextrosa + Levadura; ASD = Agar Sabouraud; Frijol= Agar con extracto de frijol; Huevo= Agar con huevo cocido; Malta= Agar con extracto de malta.

La producción de esporas en *Nomuraea rileyi* fue relativamente abundante en los medios de cultivo alternativos basados en frijol o malta, los cuales incluso mostraron mayor cantidad de esporas que en medio PDA-L, el cual también fue sobresaliente (Fig. 20).

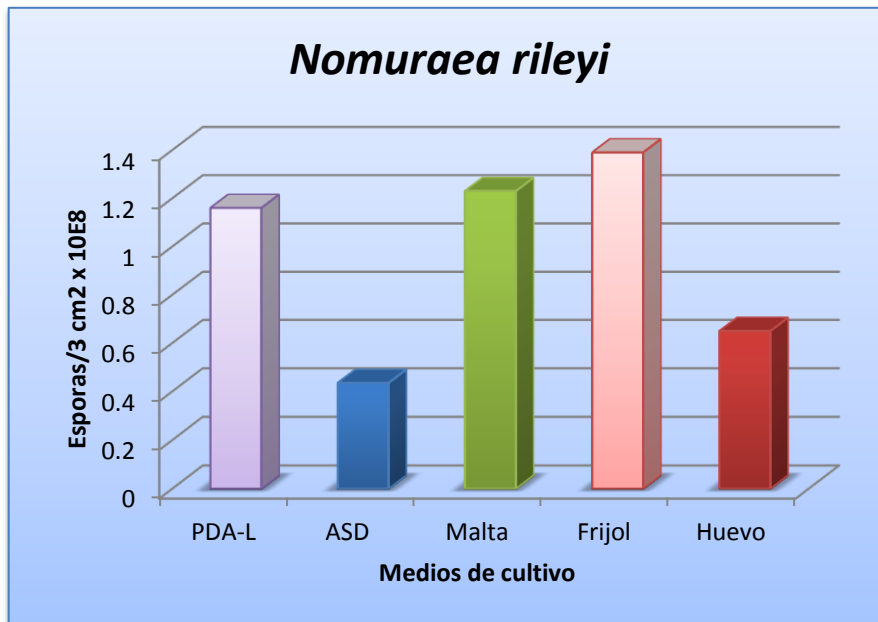


Figura 20. Producción de esporas en *Nomuraea rileyi* en diversos medios de cultivo sólidos. PDA= Agar Papa Dextrosa + Levadura; ASD= Agar Sabouraud; Frijol= Agar con extracto de frijol; Huevo= Agar con huevo cocido; Malta= Agar con extracto de malta.

En el caso de *Sporothrix (Torrubiella)* (Fig. 21), el medio sólido de cultivo con malta produjo una esporulación abundante y notable con respecto al resto de los medios de cultivo evaluados incluso sobrepasando en más del doble a la mayoría de ellos. La producción de esporas registrada en este medio fue de con 16.61 esporas/3 cm² x 10E⁷. El menor registro de esporulación se obtuvo en el medio sólido PDA-L con 2.47 esporas/3 cm² x 10E⁷.

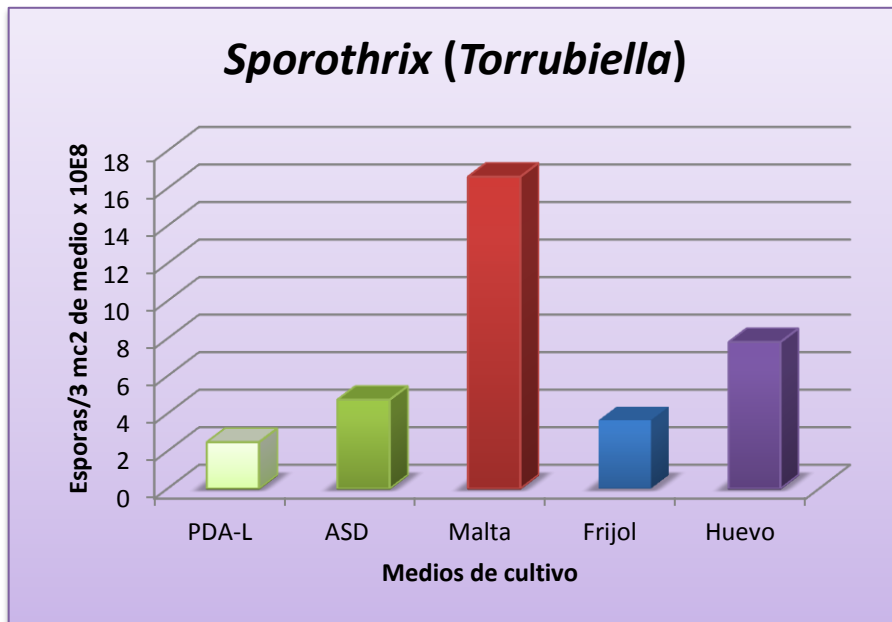


Figura 21. Producción de esporas *Sporothrix (Torrubiella)* en diversos medios de cultivos sólidos. PDA= Agar Papa Dextrosa + Levadura; ASD = Agar Sabouraud; Frijol= Agar con extracto de frijol; Huevo= Agar con huevo cocido; Malta= Agar con extracto de malta.

En el presente estudio se encontró que los medios e ingredientes alternativos, especialmente frijol y huevo, además de mostrar resultados sobresalientes para la producción de hongos entomopatógenos de interés para el control del psílido asiático de los cítricos, presentan algunas ventajas que podrían impulsar su aprovechamiento: el costo de uso es muy bajo, existe una gran facilidad de almacenamiento (especialmente el frijol), y son fácilmente conseguibles posiblemente en cualquier localidad donde se contemple utilizarlos para la producción de dichos hongos, lo cual podría impulsar el control biológico del vector del Huanglongbing, ante la posible facilidad para disponer de estos importantes agentes reguladores de plagas.

CONCLUSIONES

El medio sólido adicionado con huevo favoreció el crecimiento radial de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* e *Hirsutella citriformis*; mientras que el medio Agar Sabouraud permitió el mayor crecimiento en *H. citriformis*, *Metarhizium anisopliae* y *Nomuraea rileyi*; el medio con malta fue el que permitió el mayor crecimiento de *Isaria fumosorosea* y *Sporothrix (Torrubiella)*.

La mayor producción de esporas fue obtenida con el medio Agar Sabouraud en *B. bassiana*; el medio con huevo incrementó la producción de esporas en *H. citriformis* e *I. fumosorosea*. En el caso de los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Sporothrix (Torrubiella)* el medio con malta fue el que favoreció la producción de esporas. En *Nomuraea rileyi* el medio con extracto de frijol fue donde el hongo mostró la mayor producción de esporas.

LITERATURA CITADA

- Alarcón, C.J. 2009. Avances del Programa Nacional para la Determinación del HLB en México. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Veracruz. (Divulgación y CESVVER Xalapa, Ver.). [http:// www.funprover.org/agroentorno/septiembre/avances.pdf](http://www.funprover.org/agroentorno/septiembre/avances.pdf).
- Alvés, S. B., Neto, S., Macedo, N., and R. M. Pereira.1987. Estudio de formulaciones de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok, en diferentes condiciones de almacenamiento. *Ecosistema* 12: 78-87.
- Alves, S.B. and Pereira, R.M. (1989). Production of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. in Plastic Trays. *Ecosistema* 14:188-192.
- Arango, G.L., C. Torres Y S.L. Lapointe. 1994. Patogenicidad de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* sobre huevos y ninfas de *Aeneolamia varia* (Fabricius) (Homoptera: *Cercopidae*). *Revista Colombiana de Entomología*, 20: 43-46.
- Boman, H.G., I. Faye, G.H. Gudmundsson, J.Y. Lee, D.A. Lidholm, 1991. Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *European Journal of Biochemistry* 201:23–31.
- Bucher, G. E. 1964. The regulation and control of insects by fungi. *Ann. Soc. Entomol. Quebec*. 9: 30-42.
- Cabrera, R. I, C. González, D, Hernández, y J. R. Tapia. 2001. Presencia del hongo *Hirsutella citriphormis* Speare sobre *Diaphorina citri* Kuw. (Homóptera, *Psyllidae*) en cítricos de Cuba. IV Seminario Cientif. Internac. de Sanidad Vegetal. Varadero. Pág. 273.

- Cáceres, S. (2002). El Psílido asiático *Diaphorina citri*, plaga potencial de los citrus: situación en Corrientes. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Charnley, A. 1984. Physiological aspects of destructive patogénesis in insects by fungi: A speculative review. In: Invertebrate-microbial interactions. Anderson, J., A. Rayner and D. Walton. Cambridge University Press. Cambridge. Pp 229-270.
- Chase, M.R., K. Raina, J. Bruno, M. Sugumaran, 2000. Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidasas from *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30:953–967.
- CIP, 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú, 62 p.
- Dirección de Vigilancia y Monitoreo. (s/a). *Diaphorina citri* Psílido asiático de los citrus. www.sinavimo.gov.ar/files/diaphorina_citri%20.pdf
- Dunn, P.E., 1991. Insect antibacterial protein. In: Warr, G.W., N. Cohen (eds.), *Phylogenesis of Immune Function*. Plenum Press. Boca Raton, Florida. pp 19–44.
- Elósegui, O., Carr, A. (2003). Hongos entomopatógenos y antagonistas. Principales grupos. Características. Aislamiento, identificación y caracterización de hongos entomopatógenos y antagonistas. Métodos de conservación. En: Memorias del Curso Internacional “Producción y uso de Bioplaguicidas en Diferentes Agroecosistemas, INISAV, La Habana, Nov. 2003.
- Elósegui, O; Nieves, C.; Díaz, R.; Padrón, N; Carr, A. (2003). Comportamiento del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Cepa LBb-1 en Agar Sabouraud dextrosa producido en Cuba. *Fitosanidad*: Vol. 7 (2).

- Elrod–Erickson, M., S. Mishra, D. Schneider, 2000. Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Current Biology* 10:781–784.
- Feng, M. G, J. B. Johnson & L. P. Kish. 1990. Survey of entomopathogenic fungi naturally infecting cereal aphids (Homoptera: *Aphididae*) of irrigated grain crops in southwestern Idaho. *Environ. Entomol.* 19(5): 1534-1542.
- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pest by entomogenous fungi. In: Annual review of entomology. 23:409-442.
- Ferron, P. 1975. Les champignons entomopathogènes. Evolution des recherches au cours de dix dernières années. *Bull. OILB*, 3: 54p.
- Gibellula Cavara, *Atti Ist. bot. R. Univ. Pavia*, 2 Sér. 3: 347 (1894).
- González, C. J. C., Castellanos, S. I. E., Fucikovsky, Z. J., López, H. M., Sánchez, R. G y Elorza, M. P. 2008. Dinámica de población y tasa de infección de *Diaphorina citri* al hongo *Hirsutella citriformis* en *Citrus sinensis* en Tuxpan, Veracruz, México. 1p.
- González, C., M. Borges, D. Hernández, Jorge R. Tapia, A. Beltrán. 2000 a. Inventario de enemigos naturales de *Diaphorina citri* Kuw. (Homóptera: Psyllidae) en Cuba. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, IX Congr. 859.
- González, Hernández, Rodríguez, J. 2001. Influencia de los enemigos naturales en el comportamiento de *Diaphorina citri* (Kuw) (Homóptera, *Psyllidae*) en los cítricos de Cuba. En: *Rev. Protección Veg.* Vol. 17 No. 3, página 200.
- Hajek, A.E., R.J. St. Leger, 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* 39:293:322.

- Hall, R.A. 1980. Comparison of laboratory infection of aphids by *Metarhizium anisopliae* and *Verticillium lecanii*. *Annals of Applied Biology*, 95: 159-162.
<http://www.inta.gov.ar/bellavista/info/documentos/citricos/ps%EDlido.htm>
- Humber, R.A. 1991. Fungal pathogens of aphids. In: *Proceedings Aphid-plant interactions: Populations to Molecules*, Oklahoma EUA. p. 45-56.
- Ignoffo, CM, DL Hostetter, C. Garcia y R. E. Pinnel. 1975. Sensitivity of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* to chemicals pesticides used on soybeans. *Environ. Entomol.* 4: 765-768.
- INISAV. 2006. Metodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal.
<http://www.inisav.cu/OtrasPub/METODOS%20ARTESANALES%20DE%20PRODUCCION%20DE%20BIOPLAGUICIDAS.pdf>
- James, R.R., J.S. Buckner, T.P. Freeman, 2003. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 84:67–74.
- Johnsona Desiree, Gi-Ho Sunga, Nigel L. Hywel-Jonesb, J. Jennifer Luangsa-Ardc, Joseph F. Bischoffd, Ryan M. Keplera, Joseph W. Spataforaa, 2008. Systematics and evolution of the genus *Torrubiella* (Hypocreales, Ascomycota). *Mycological Research*.
- Kan, H., C.H. Kim, , H.M. Kwon, J.W. Park, , K.B. Roh, , H. Lee, B.J. Park, R. Zhang, J. Zhang, K. Soderhall, N.C. Ha, , B.L. Lee, 2008. Molecular control of phenoloxidase–induced melanin synthesis in an insect. *Journal of Biological Chemistry* 283:25316–23.

- Khachatourians, G.G., 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In *The Mycota VI. Human and Animal Relationships*, Howard/Miller eds., Springer-Verlag, Berlin. pp 331–364.
- Lacey, L. A., A. A. Kirk, L. Millar, G. Mercadier, and C. Vidal. 1999. Ovicidal and larvicidal activity of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: *Aleyrodidae*) with a description of a bioassay system allowing prolonged survival of control insects. *Biocontrol Sci. Technol.* 9 (1): 9-18.
- Lecuona, R.E. ed. 1996. *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. Argentina. Talleres gráficos Mariano. 338p.
- Levitin, A., M. Whiteway, 2008. *Drosophila* innate immunity and response to fungal infections. *Cellular Microbiology* 10:1021–1026.
- Lourenco, A.P., M.S. Zufelato, M.M.G. Bitondi, Z.L.P. Simões, 2005. Molecular characterization of a cDNA encoding prophenoloxidase and its expression in *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35:541–552.
- MacLeod, D. M. 1954. Investigation on the genera *Beauveria bassiana* Vuill., and *Tritirachium* Limber. *Can., J., Bot.*, 32: 818-890.
- Marmaras, V.J., N.D. Charalambidis, C.G. Zervas, 1996. Immune response in insects: the role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 31:119–133.
- Mead, F. W. (2007). Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Insecta: Homoptera: Psyllidae). University of Florida. IFAS Extensión. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN16000.pdf>

- Meister, M., B. Lemaitre, J.A. Hoffmann, 1997. Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *Bioassays* 19:1019–1026.
- Meyer, J. M. A., y Boucias, D. G. 2007. Morphological and molecular characterization of a *Hirsutella* species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. En: *Journal of Invertebrate Pathology*, 95: 101-109.
- Ouedraogo, R., M. Cusson, M. Goettel, J Brodeur, 2003. Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *Journal of Invertebrate Pathology* 82: 103–109.
- Pérez, C.N. 2004. Manejo Ecológico de Plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural – CEDAR. 296 pp.
- Richard, F.J., A. Aubert, C.M. Grozinger, 2008. Modulation of social interactions by immune stimulation in honey bee, *Apis mellifera*, workers. *BMC Biology* 6:1–13.
- Rivero-Aragón, A., y Grillo-Ravelo. 2000. Natural enemies of *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: *Psyllidae*) in the central region of Cuba. *Centro-Agrícola* 27(3):87-88.
- Rosset, P., y M. Moore. 1998. La seguridad alimentaria y la producción local de biopesticidas en Cuba. *Boletín del ILEIA* del mes de Junio. 18-19p.
- SAGARPA. 2010. Medidas contra plagas del “Dragón Amarillo”, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. México, D.F. (SENASICA, Comunicado 355, Agosto de 2010).
- Salguero, V. 1993. Perspectiva para el manejo del complejo mosca blanca-virosis. pp. 20-26. In: L. Hilje (ed.). *Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y El Caribe*. Orlando Arboleda. Costa Rica.

- Samson, R.A., H.C. Evans and J.P. Latgé. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer, Verlag, Berlin.
- Samuels, R.I., I.C. Paterson, 1995. Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry Physiology* 110:661–669.
- Sanchez-Peña, S. R. 1993. Entomogenous fungi associated with the cotton aphid in the Texas High Plains. *Southwestern Entomologist* 18(1): 69-70.
- Sandino D., V.M. 2003. Manejo integrado de la salivita de la caña de azúcar. Nicaragua. FUNICA/UNA/CATIE, 26p.
- Starks, P., C.A. Blackie, T. Seeley, 2000. Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften*. 87:229–231.
- Subandiyah S. Nikoh N., Sato, H., Wagiman, F. Tuyumu, S. y Fukatsu, T. 2000. Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera, *Psyllidae*) in Indonesia. *Mycoscience* 41: 509-513. pg. 509-513.
- Tanada, Y. And H. K. Kaya. 1993. *Insect pathology*. Academic Press, San Diego, California, USA: 666p.
- Tang, H., Z. Kambris, B. Lemaitre, C. Hashimoto, 2006. Two proteases defining a melanization cascade in the immune system of *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry* 281:28097–28104.
- Téllez–Jurado Alejandro, Ma. Guadalupe Cruz Ramírez, Yuridia Mercado Flores, Alí Asaff Torres, Ainhoa Arana–Cuenca, 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología*. Vol. 30.

Toriello. C., H. Navarro-Barranco, M.L. Almengor y T. Mier. 1999. Aplicación de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin como bioinsecticida contra la mosca pinta (Homoptera: *Cercopidae*) en pastizales para ganado en Guatemala. Revista Mexicana de Micología, 15: 119- 121.

Ulloa M., Herrera T. (1994). Etimología e iconografía de géneros de hongos. Cuadernos del Instituto de Biología N° 21. UNAM. Ed., México, pp 300.

Vicentini, S; Magalhaes, B.P. 1996. Infection of the grasshopper, *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride* Gams y Rozsypal. Anais da Sociedade Entomologica do Brasil 25(2):309-314.
Volume 113, Issue 3, March 2009, Pages 279–289.

Wilson, K., A.F. Reeson, 1998. Density–dependent prophylaxis: evidence from Lepidoptera– baculovirus interactions? Ecological Entomology 23:100–101.

Wilson, K., M. Thomas, S. Blanford, M. Doggett, S. Simpson, S. Moore, 2002. Density–dependent disease resistance in desert locusts. Proceedings of the National Academy of Sciences 99:5471–5475.
www.sinavimo.gov.ar/files/diaphorina_citri%20.pdf

Yokomi, R. K. 1994. Potential for biological control of *Toxoptera citricida* (Kirkaldy). USDA, ARS. Horticultural Research Laboratory. Orlando, FL. pp. 1-11.