

Taxonomía y Sistemática

Hongos entomopatógenos asociados a *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en Colima, México

Entomopathogenic fungi associated to Diaphorina citri (Hemiptera: Liviidae) in Colima, Mexico

Angélica María Berlanga-Padilla, Adrien Gallou, Miguel Angel Ayala-Zermeño*,
María Guadalupe Serna-Domínguez, Roberto Montesinos-Matías, José Carlos Rodríguez-Rodríguez
y Hugo César Arredondo-Bernal

Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, SENASICA-DGSV, Km. 1.5 Carretera Tecomán-Estación FFCC, Col. Tepeyac, 28110
Tecomán, Colima, México

*Autor para correspondencia: ayalazermeño@yahoo.com.mx (M.A. Ayala-Zermeño)

Recibido: 2 junio 2017; aceptado: 3 mayo 2018

Resumen

Diaphorina citri es el vector del Huanglongbing (HLB), enfermedad devastadora de los cítricos a escala mundial. Se realizó la búsqueda de hongos entomopatógenos (HE) como agentes potenciales de control biológico de *D. citri* en huertas comerciales de cítricos y plantas de mirto en zonas urbanas del estado de Colima, México. Los hongos que se encontraron asociados a la plaga fueron aislados e identificados por métodos morfológicos y moleculares. Se aislaron 30 cepas de HE del orden Hypocreales: *Hirsutella citriformis*, *Isaria javanica*, *Beauveria bassiana* y *Simplicillium lanosoniveum*; 2 géneros de HE del orden Entomophthorales (*Batkoa* sp. y *Entomophthora* sp.) de los cuales no se logró su aislamiento. Se reporta por primera ocasión, la incidencia natural de *Simplicillium lanosoniveum* y *Batkoa* sp. asociados a *D. citri* en Colima, México. Por la incidencia con la que se encontró a *H. citriformis*, podría considerarse como un buen candidato para el control biológico del psílido *D. citri*, que al igual que las especies de Entomophthorales, abren la posibilidad de explorar su potencial como agentes microbianos de este psílido.

Palabras clave: Caracterización; Morfología; Control biológico; Cítricos; Huertos comerciales; Hypocreales; Entomophthorales

Abstract

Diaphorina citri is the vector of Huanglongbing (HLB), a devastating disease of citrus fruits worldwide. We searched for entomopathogenic fungi (EF) as potential biological control agents of *D. citri* in commercial citrus orchards and myrtle plants in urban areas of the state of Colima, Mexico. The fungi that were found associated with the pest were isolated and identified by morphological and molecular methods. Thirty strains of EF were isolated from

the order Hypocreales: *Hirsutella citriformis*, *Isaria javanica*, *Beauveria bassiana*, and *Simplicillium lanosoniveum*; 2 genera of Entomophthorales (*Batkoa* sp. y *Entomophthora* sp.) with unsuccessful isolation. The natural incidence of *Simplicillium lanosoniveum* and *Batkoa* sp. associated with *D. citri* in Colima, Mexico is reported for the first time. Due to the incidence of *H. citriformis*, it could be considered as a good candidate for the biological control of the psyllid *D. citri*, as the Entomophthorales species, all of them open the possibility of exploring their potential as microbial agents of this psyllid.

Keywords: Characterization; Morphology; Biological control; Citrus fruit; Commercial orchards; Hypocreales; Entomophthorales

Introducción

El psílido asiático de los cítricos (PAC) *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), es el vector de las bacterias gram-negativas ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, ‘*Ca. L. americanus*’, ‘*Ca. L. africanus*’ y ‘*Ca. L. caribbeanus*’, esta última recientemente encontrada en Colombia (Keremane et al., 2015). Estas bacterias son agentes causales de la enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB) de los cítricos que tiene un efecto devastador a escala mundial (Bové, 2006; Hall, Richardson et al., 2012). Considerando el riesgo de la enfermedad y su vector, se recomienda como estrategias controlar las poblaciones del PAC con insecticidas sintéticos, eliminar árboles enfermos y realizar siembra de plantas libres de enfermedades (Brlansky et al., 2006). El control químico constituye una importante herramienta para reducir la población de *D. citri*; sin embargo, las aplicaciones foliares dirigidas al control de adultos y ninfas, proporcionan un periodo corto de protección y tienen un efecto nocivo sobre la entomofauna benéfica (Qureshi et al., 2009). Para limitar la dispersión del HLB y disminuir la densidad poblacional de *D. citri* se requiere de un esquema de manejo integrado, ya que el uso continuo de insecticidas químicos puede originar la selección de psílicos resistentes (Hoy, 1998). Lo anterior plantea buscar y desarrollar alternativas como el control biológico, esta estrategia aspira, a la conservación de enemigos naturales de las plagas en los sistemas agrícolas. Los agentes de control biológico de *D. citri* reportados son varios artrópodos depredadores y parasitoides (Hall, Richardson et al., 2012), además de la infección natural de diferentes especies de hongos entomopatógenos (HE) como *Hirsutella citriformis* Speare (Étienne et al., 2001; Rivero-Aragón y Grillo-Ravelo, 2000; Subandiyah et al., 2000); *Isaria fumosorosea* Wize (≡ *Paecilomyces fumosoroseus*) (Samson, 1974; Subandiyah et al., 2000); *Isaria javanica* (Friedrichs y Bally) Samson y Hywel-Jones (≡ *Paecilomyces javanicus*) (Yang et al., 2006); *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Zare y W. Gams (≡ *Verticillium lecanii*) (Rivero-Aragón y Grillo-Ravelo, 2000; Xie et al., 1988; Yang et al., 2006) y

Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin (Rivero-Aragón y Grillo-Ravelo, 2000; Yang et al., 2006).

Las alternativas a los plaguicidas sintéticos como el control biológico son relevantes y pueden ser aprovechadas para llevar a cabo un manejo integrado de plagas (MIP) o cualquier tipo de acción fitosanitaria. En México, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (Senasica) a través de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV), desarrolló un programa de control biológico para el manejo de *D. citri* a través del uso de HE y del parasitoide *Tamarixia radiata* (Waterston) (Sánchez-González et al., 2015). Con el propósito de contar con una mayor cantidad de enemigos naturales de esta plaga, el presente trabajo tuvo como objetivo realizar exploraciones para conocer las especies de HE asociados a *D. citri* en huertos comerciales de cítricos y en plantas de *Murraya paniculata* (L) Jack en el estado de Colima, México.

Materiales y métodos

Las exploraciones para la recolección de los insectos se realizaron en huertos comerciales de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle), limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) y plantas de mirto o limonaria (*M. paniculata*) del área urbana en los municipios de Tecmán, Armería y Manzanillo, en Colima, México, desde el año 2012 hasta 2014. El muestreo fue dirigido a los diferentes estadios del insecto. Para recolectar huevos y ninfas, se tomaron brotes tiernos de la planta, los cuales fueron colocados en bolsas de papel. En insectos adultos se buscaron signos y síntomas de infección por hongos, incluyendo alteraciones en la conducta, cambios de coloración, momificación o presencia de micelio y conidios en la superficie de su cuerpo. Los insectos con estas características se recolectaron en forma individual tomando la hoja o parte del sustrato en que se encontraban y se depositaron individualmente en contenedores secos, evitando las partículas de tierra y otros contaminantes. También se incluyó la recolecta de insectos muertos sin indicios aparentes de infección; el material fue colocado

en viales entomológicos debidamente etiquetados y depositados en una hielera de poliestireno con geles refrigerantes y llevados al laboratorio para su análisis.

Los insectos recolectados en campo se examinaron en un microscopio estereoscópico (Stemi 2000-C, Carl Zeiss), para visualizar los signos externos característicos de las especies de HE. Los insectos muertos carentes de signos de infección fueron colocados en cámara húmeda (K_2SO_4 , al 11%) a 25 °C para favorecer el desarrollo de posibles HE (Goettel e Inglis, 1997); una vez que el hongo se desarrolló, se procedió a revisar las estructuras morfológicas. Los especímenes con signos de micosis se examinaron mediante la preparación de laminillas con lactofenol azul de algodón (10:1) o aceto orceína según el HE. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio óptico (AXIO SCOPE A1, Carl Zeiss) para analizar las características morfológicas. Se consideraron las estructuras de reproducción asexual (conidios y conidióforos) para su identificación taxonómica, tomando como referencia las claves reportadas por Humber (2012). Para realizar la identificación específica se procedió a evaluar su morfometría; para ello se realizaron preparaciones de insectos micosados y microcultivos de acuerdo con Ayala-Zermeño et al. (2015). Se tomaron fotografías con el objetivo 100× (AXIO SCOPE A1) y una cámara digital AxioCam ICc 1 (Carl Zeiss) utilizando el software AxionVision 4.9.1 (03-2013). Por cada uno de los aislados se midieron 30 conidios y 30 fialides considerando largo y ancho de cada estructura.

Para purificar los aislados a partir del insecto, se seleccionaron especímenes con micosis utilizando la transferencia directa de esporas y el método de descarga de conidios acorde a la especie de hongo causante de la infección (Hayek et al., 2012). Se utilizaron los medios de cultivo Sabouraud dextrosa agar (SDA) suplementado con extracto de levadura [$g L^{-1}$: dextrosa 40, peptona de carne 5, peptona de caseína 5, extracto de levadura 10, agar 15] y SDA suplementado con yema de huevo (120 mL) y leche (80 mL); la incubación se realizó a 25 ± 2 °C hasta su esporulación. Los hongos aislados fueron depositados en la Colección de Hongos Entomopatógenos (CHE) del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB-DGSV), con el acrónimo CHE-CNRCB correspondiente.

El ADN genómico de la mayoría de los aislados fue extraído a partir de 10 mg de micelio liofilizado y macerado con un balón de tungsteno (3 mm) o acero (5 mm) en el equipo TissueLyser II™ (Qiagen Valencia, USA) y usando el kit DNeasy Plant Mini (Qiagen, Valencia, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La extracción de ADN de los aislados CHE-CNRCB 373 y 375 se llevó a cabo con 10 mg de micelio liofilizado macerado con nitrógeno líquido en un mortero y el procedimiento

convencional descrito por Amer et al. (2011). Los parámetros de calidad del ADN genómico extraído (i.e., pureza, concentración e integridad) se determinaron según Gallou et al. (2016). Acorde con el género, las regiones utilizadas para la identificación fueron las siguientes: la región intergénica Bloc (5.3F/B5.1R; Rehner et al., 2006), el factor de elongación de traducción 1 α (TEF) (983F/2218R; Carbone y Kohn, 1999; Rehner y Buckley, 2005) y los espaciadores internos transcritos (ITS) (ITS5/ITS4; White et al., 1990) para los aislados del género *Beauveria*. Las regiones TEF e ITS para los aislados del género *Isaria*. La subunidad pequeña ribosomal (SSU) (NS1/NS4; White et al., 1990), la subunidad 1 de la ribopolimerasa II (RPB1) (CRPB1A/RPB1Cr; Castlebury et al., 2004), el TEF y la región ITS para los aislados del género *Hirsutella*, y la región ITS para el género *Simplicillium*. La mezcla de reacción de PCR para cada región a amplificar consistió de Polimerasa Phire Hot Start II (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 1X del buffer Phire Reaction (ThermoFisher Scientific), 0.2 mM del mix de dNTPs, 0.4 μ M de cada primer y 1-20 ng de ADN genómico, ajustados a un volumen final de 25 μ L. Los programas de amplificación por PCR se efectuaron como sigue: para Bloc, 1 ciclo de desnaturalización inicial a 98 °C por 30 s, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 98 °C por 5 s, alineación a 56 °C por 5 s y extensión a 72 °C por 22 s, con 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 1 min. TEF, 1 ciclo de desnaturalización inicial a 98 °C por 30 s, seguido de 10 ciclos de: 98 °C por 5 s, 66 °C (disminuyendo 1 °C por ciclo) por 5 s y 72 °C por 15 s, en seguida 30 ciclos de: 98 °C por 5 s, 56 °C por 5 s y 72 °C por 15 s y por último, un ciclo de extensión final a 72 °C por 1 min. ITS, 1 ciclo de desnaturalización inicial a 98 °C por 30 s, seguido de 36 ciclos a 98 °C por 5 s, 55 °C por 5 s, 72 °C por 9 s y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 1 min. SSU, 1 ciclo de desnaturalización inicial a 98 °C por 30 s, seguido de 4 ciclos de: 98 °C por 5 s, 55 °C (disminuyendo 1 °C por ciclo) por 5 s y 72 °C por 15 s, continuando con 42 ciclos de: 98 °C por 5 s, 50.5 °C por 5 s y 72 °C por 15 s, con 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 1 min. RPB1, 1 ciclo de desnaturalización inicial a 98 °C por 30 s, seguido de 4 ciclos de: 98 °C por 5 s, 47 °C por 5 s y 72 °C por 10 s, continuando con 40 ciclos de: 98 °C por 5 s, 47 °C por 5 s y 72 °C por 10 s, con 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 1 min. La purificación de los productos de PCR se realizó con el kit Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System Kit (Promega, Madison, EUA). Para la secuenciación de los amplicones se utilizaron los primers de PCR y en algunos casos, primers adicionales específicos a las regiones Bloc Brint, Bfn6, B822Ldg, B22Udg, Bfn2 y BRn2 (Rehner et al., 2011) y TEF 1577F y 1567R (Rehner y Buckley,

2005) para los géneros *Beauveria* e *Isaria* (Macrogen, Seúl, Corea del Sur).

La edición y el ensamble de las secuencias se realizó en el programa BioEdit 7.2.0 (Hall, 1999). Las secuencias correspondientes a cada región fueron depositadas en el GenBank (tabla 1). Los alineamientos múltiples se efectuaron con MUSCLE (Edgar, 2004) para el género *Simplicillium* y MAFFT (Kato et al., 2002) para los géneros *Beauveria*, *Isaria* e *Hirsutella*. El análisis filogenético para el género *Beauveria* se realizó por inferencia bayesiana (IB) derivada de la concatenación de las regiones Bloc, TEF e ITS. Se utilizaron 2 modelos de evolución de acuerdo con el programa jModelTest 2.1.10 (Darrriba et al., 2012): Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) con una distribución gama para las regiones Bloc e ITS, mientras que para el TEF, se usó el modelo “general time reversible” (GTR) con sitios invariantes y una distribución gama. El análisis fue llevado a cabo con 1,000,000 de generaciones y un muestreo cada 100 árboles en el programa MrBayes 3.2.5 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Las secuencias de las cepas de referencia tipo se obtuvieron de Rehner et al. (2011), mientras que las secuencias de *Isaria cicadae* ARSEF 7260, *I. tenuipes* ARSEF 4096, *I. farinosa* ARSEF 4029 y *Cordyceps militaris* ARSEF 5050 se utilizaron como grupo externo. El análisis filogenético para el género *Isaria* se realizó por IB con las regiones TEF e ITS de forma individual. Se utilizaron 2 modelos de evolución acorde al programa jModelTest 2.1.10 (Darrriba et al., 2012): Kimura de 2 parámetros (K80) con una distribución gama

para el TEF, mientras que para el ITS, se usó el modelo HKY con una distribución gama. El análisis fue llevado a cabo con 1,400,000 generaciones y un muestreo cada 100 árboles para el TEF y con 1,000,000 de generaciones y un muestreo cada 100 árboles para el ITS en el programa MrBayes 3.2.5 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Las cepas de referencia tipo se obtuvieron de Cabanillas et al. (2013), mientras que las cepas *Metarhizium marquandii* CBS 182.27, *M. robertsii* ARSEF 727 e *Hirsutella* sp. OSC 128575 se utilizaron como grupo externo. El análisis filogenético para el género *Hirsutella* se realizó por IB derivada de la concatenación de las regiones SSU, TEF y RPB1. Se utilizó el modelo GTR con una distribución gama y sitios invariantes para las 3 regiones con base al jModelTest 2.1.10 (Darrriba et al., 2012). El análisis bayesiano se realizó con 1,000,000 de generaciones y un muestreo cada 100 árboles en el programa MrBayes 3.2.5 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Las cepas de referencia tipo se obtuvieron de Quandt et al. (2014), mientras que las cepas *Metarhizium guizhouense* ARSEF 5714, *M. majus* ARSEF 3145, *Pochonia chlamydosporia* CBS 504.66 y *P. chlamydosporia* CBS 101244 se utilizaron como grupo externo. Para el IB de los géneros *Beauveria*, *Isaria* e *Hirsutella*, los árboles resultantes se visualizaron en FigTree 1.4.2 (Rambaut, 2014) y se calculó un árbol de consenso del 50%. El análisis filogenético para el género *Simplicillium* se realizó con el método de máxima verosimilitud (MV) de la región ITS. Se utilizó el modelo de evolución de Tamura de 3 parámetros con base al

Tabla 1
 Especies, acrónimos y número de acceso en el GenBank.

Especie	Acrónimo	Número de acceso en el GenBank				
		TEF	ITS	Bloc	RPB1	SSU
<i>Hirsutella citriformis</i>	335	KY587203	KU725692	-	KY587213	KY587216
	339	KY587204	-	-	KY587214	KY587217
	338	KU725695	-	-	KU725698	KU725707
	375	KY587205	-	-	KY587215	KY587218
<i>Isaria javanica</i>	357	KY587206	KX686124	-	-	-
	358	KY587207	KX686125	-	-	-
	363	KY587208	KX686126	-	-	-
<i>Beauveria bassiana</i>	167	KU725693	KX686119	KY587219	-	-
	168	KU725693	KU725691	KU725706	-	-
	169	KY587210	KX686120	KY587220	-	-
	170	KY587211	KX686121	KY587221	-	-
	365	KY587212	KX686122	KY587222	-	-
<i>Simplicillium lanosoniveum</i>	373	-	KX686123	-	-	-

programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Se aplicó una distribución gamma para el análisis con 1,000 réplicas de bootstrap. Las cepas de referencia tipo se obtuvieron de Nonaka et al. (2013), mientras que las cepas *Torrubiella luteorostrata* CBS 398.86, *Verticillium chlamydosporium* CBS 103.65 y *Pochonia chlamydosporia* ARSEF 2218 se utilizaron como grupo externo.

Resultados

Las exploraciones realizadas en huertos comerciales de limón y plantas de *M. paniculata* permitieron recolectar insectos infectados de diferentes estadios de desarrollo con signos de micosis. Los HE asociados a ninfas y adultos de *D. citri* corresponden a 6 géneros de HE, de los cuales 4

Tabla 2

Aislados de hongos entomopatógenos asociados a *Diaphorina citri* recolectados en el estado de Colima, México conservados en la Colección de Hongos Entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.

Especie	Acrónimo	Huésped (estadio)	Hospedero	Origen
<i>Hirsutella citriformis</i>	328	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus aurantifolia</i>	El Roble, Cofradía de Morelos, Tecomán, Colima, MX. 18°51'16.3" N 103°50'58.9" O
<i>Hirsutella citriformis</i>	329	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus aurantifolia</i>	El Roble, Cofradía de Morelos, Tecomán, Colima, MX. 18°51'16.3" N 103°50'58.9" O
<i>Hirsutella citriformis</i>	330	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Tecuanillo, Tecomán, Colima, MX. 18°49'00.1" N 103°52'58.8" O
<i>Hirsutella citriformis</i>	331	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Tecuanillo, Tecomán, Colima, MX. 18°49'00.1" N 103°52'58.8" O
<i>Hirsutella citriformis</i>	332	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Cofradía de Morelos, Tecomán, Colima, MX. 18°52'09.8" N 103°50'16.8" O
<i>Hirsutella citriformis</i>	333	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus aurantifolia</i>	El Roble, Cofradía de Morelos, Tecomán, Colima, MX. 18°51'16.3" N 103°50'58.9" O
<i>Hirsutella citriformis</i>	335	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Cofradía de Morelos, Tecomán, Colima, MX. 18°52'09.8" N 103°50'16.8" O
<i>Hirsutella citriformis</i>	337	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus aurantifolia</i>	El Pandelo, Tecomán, Colima, MX. 18°53'21.0" N 103°53'10.7" O
<i>Hirsutella citriformis</i>	338	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus latifolia</i>	Tecuanillo, Tecomán, Colima, MX. 18°49'00.1" N 103°52'58.8" O
<i>Hirsutella citriformis</i>	339	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus latifolia</i>	Tecomán, Colima, MX. 18°55'37.9" N 103°53'01.7" O
<i>Hirsutella citriformis</i>	340	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Tecomán, Colima, MX. 18°55'37.9" N 103°53'01.7" O
<i>Hirsutella citriformis</i>	341	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus latifolia</i>	Tecomán, Colima, MX. 18°55'37.9" N 103°53'01.7" O
<i>Hirsutella citriformis</i>	342	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Tecomán, Colima, MX. 18°55'37.9" N 103°53'01.7" O
<i>Hirsutella citriformis</i>	345	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Murraya paniculata</i>	Tecomán, Colima, MX. 18°55'37.9" N 103°53'01.7" O
<i>Hirsutella citriformis</i>	346	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Tecuanillo, Tecomán, Colima, MX. 18°49'00.1" N 103°52'58.8" O
<i>Hirsutella citriformis</i>	347	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Cofradía de Morelos, Tecomán, Colima, MX. 18°52'09.8" N 103°50'16.8" O
<i>Hirsutella citriformis</i>	350	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Ejido Augusto Gómez Villanueva, Coalatilla, Armería, Colima, MX. 19°01'00.1" N 104°00'00.0" O

Tabla 2
 Continuación.

Especie	Acrónimo	Huésped (estadio)	Hospedero	Origen
<i>Hirsutella citriformis</i>	360	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Ejido Vicente Guerrero, Tecomán, Colima, MX. 18°57'40.0" N 103°50'04.3" O
<i>Hirsutella citriformis</i>	375	<i>Diaphorina citri</i> (ninfa)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Ejido Augusto Gómez Villanueva, Coalatilla, Armería, Colima, MX. 19°01'00.1" N 104°00'00.0" O
<i>Isaria javanica</i>	356	<i>Diaphorina citri</i> (ninfa)	<i>Citrus aurantifolia</i>	El Saucito, Tecomán, Colima, MX. 18°52'00.1" N 103°48'00.0" O
<i>Isaria javanica</i>	357	<i>Diaphorina citri</i> (ninfa)	<i>Citrus aurantifolia</i>	El Saucito, Tecomán, Colima, MX. 18°52'00.1" N 103°48'00.0" O
<i>Isaria javanica</i>	358	<i>Diaphorina citri</i> (ninfa)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Tecomán, Colima, MX. 18°55'37.9" N 103°53'01.7" O
<i>Isaria javanica</i>	359	<i>Diaphorina citri</i> (ninfa)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Tecomán, Colima, MX. 18°55'37.9" N 103°53'01.7" O
<i>Isaria javanica</i>	363	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Tecomán, Colima, MX. 18°55'37.9" N 103°53'01.7" O
<i>Beauveria bassiana</i>	167	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Murraya paniculata</i>	Tecomán, Colima, MX. 18°55'37.9" N 103°53'01.7" O
<i>Beauveria bassiana</i>	168	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus aurantifolia</i>	San Miguel del ojo de agua, Tecomán, Colima, MX. 18°49'25.0" N 103°42'03.6" O
<i>Beauveria bassiana</i>	169	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Murraya paniculata</i>	Tecomán, Colima, MX. 18°55'37.9" N 103°53'01.7" O
<i>Beauveria bassiana</i>	170	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Murraya paniculata</i>	Tecomán, Colima, MX. 18°55'37.9" N 103°53'01.7" O
<i>Beauveria bassiana</i>	365	<i>Diaphorina citri</i> (adulto)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Ejido Augusto Gómez Villanueva, Coalatilla, Armería, Colima, MX. 19°01'00.1" N 104°00'00.0" O
<i>Simplicillium lanosoniveum</i>	373	<i>Diaphorina citri</i> (ninfa)	<i>Citrus aurantifolia</i>	Ejido Augusto Gómez Villanueva, Coalatilla, Armería, Colima, MX. 19°01'00.1" N 104°00'00.0" O

pertenece al orden Hypocreales: *Hirsutella* (19), *Isaria* (5), *Beauveria* (5) y *Simplicillium* (1), obteniendo un total de 30 aislados (tabla 2). Además se identificaron 2 géneros del orden Entomophthorales: *Batkoa* y *Entomophthora*, de los cuales no fue posible obtener los aislados.

Hirsutella citriformis fue el hongo con mayor incidencia y distribución, se encontró en todos los huertos muestreados infectando adultos, aunque en el verano de 2014 se encontraron 3 ninfas infectadas por *H. citriformis* en la comunidad de Coalatilla en Armería, siendo el primer reporte de infección de esta especie sobre ninfas en México. Los PAC infectados con este hongo se encontraban adheridos a hojas y ramas en limón y limonaria, cubiertos por micelio blanco a grisáceo, su característica particular fue la presencia de sinemas largos y cilíndricos de tamaño variable que emergían del tórax del insecto, en algunos casos ramificados, regularmente

con protuberancias cónicas en la base del sinema (fig. 1a, b). La estructura conidiógena mostró forma de botella con la base ensanchada y la parte distal con un cuello delgado y alargado, distribuidas a lo largo del sinema (fig. 1c, d) y los conidios mostraron una forma fusiforme (fig. 1e).

Del material recolectado se obtuvieron 19 aislados que se registraron con los acrónimos CHE-CNRCB 328, 329, 330, 331, 332, 333, 335, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 345, 346, 347, 350 y 360, todos ellos de adultos y el aislado 375 obtenido a partir de ninfas del psílido. Considerando la morfometría de 5 aislados, presentaron variabilidad en sus dimensiones (tabla 3). La longitud de las fiálides mostraron un intervalo de 24.61 - 29.32 µm de cuello y la base de las fiálides mostró valores entre 5.82 - 6.73 µm. Las dimensiones de los conidios fueron de 6.95 - 7.68 × 2.09 - 2.54 µm (largo × ancho). El análisis filogenético por IB derivada de la concatenación de las regiones SSU,

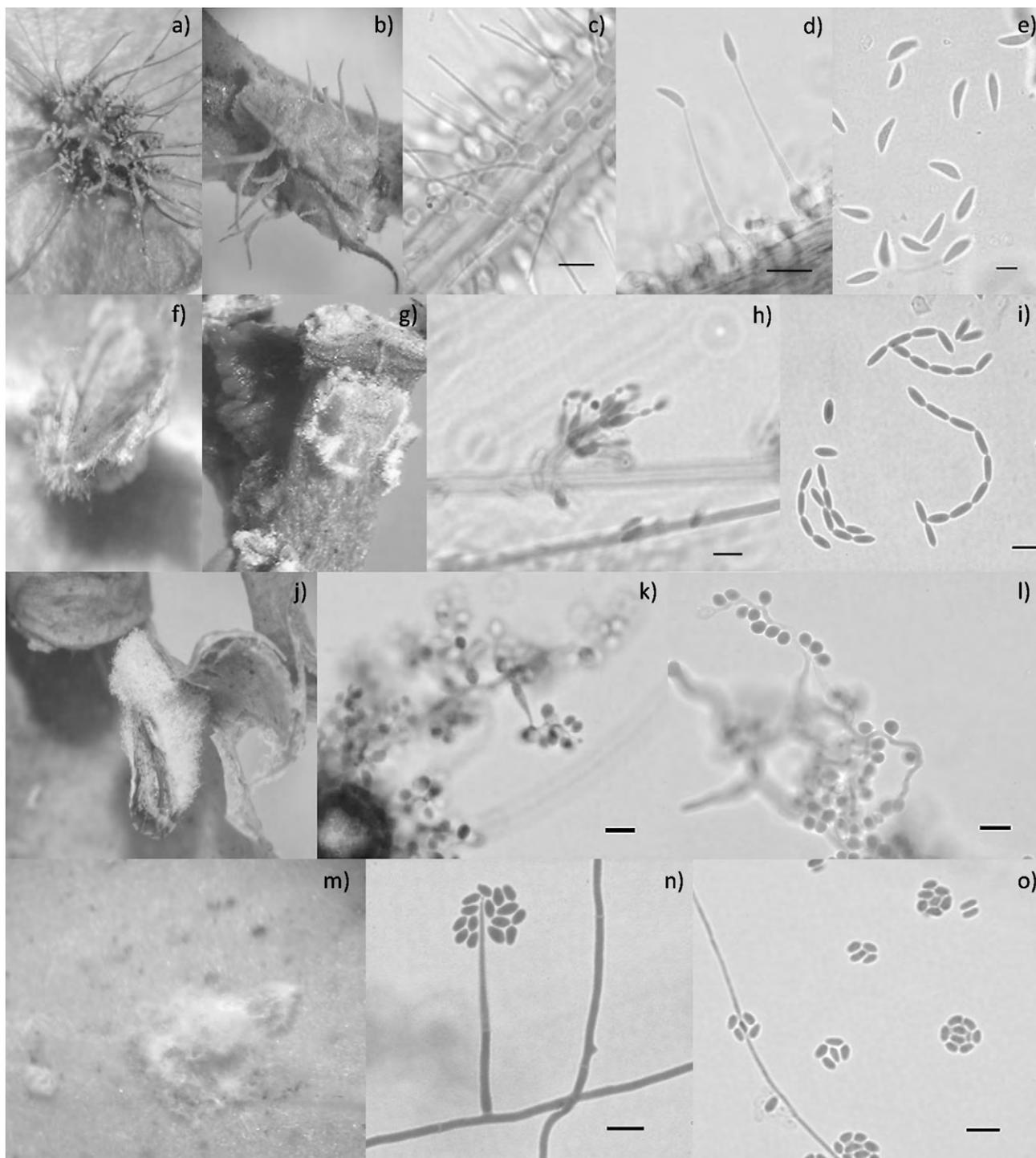


Figura 1. *Diaphorina citri* infectada con hongos entomopatógenos. *Hirsutella citrifomis* infección sobre adulto (a) y ninfa (b). Estructuras morfológicas de *H. citrifomis*: sinema con fiálides (c), fialide esporulando (d), conidios sueltos (e). *Isaria javanica* en adulto (f) y ninfa (g), estructuras morfológicas: fiálides (h) y conidios (i). *Beauveria bassiana* sobre adulto (j), morfología de las fiálides y conidios (k), conidios en raquiz (l). *Simplicillium lanosoniveum* en ninfa (m), fiálide con esporas (n), conidios en cabezas (o). Barras de figuras (c) = 20 μm , (d) = 10 μm , (e, h, i, k, l, n y o) = 5 μm .

TEF y RPBI de las muestras de *Hirsutella* spp. mostró que los aislados CHE-CNRCB 335, 338, 339 y 375 forman parte del clado de *H. citriformis* y en el que se incluyen los 2 aislados *H. citriformis* ARSEF 1035 y ARSEF 1446 (fig. 2). La rama tiene un apoyo fuerte y significativo de 100% de probabilidades posteriores por IB (PP IB).

Isaria javanica. Durante los muestreos de campo se encontraron ninfas y adultos del PAC infectadas con *I. javanica* en 2 huertos de limón del municipio de Tecomán, los insectos momificados tenían apariencia polvosa grisácea. Los adultos momificados se observaron adheridos al follaje en posición de alimentación con el abdomen cubierto por el hongo (fig. 1f). En ninfas se observó micosis en la parte ventral sobresaliendo por sus costados (fig. 1g). Se obtuvieron 5 aislados CHE-CNRCB 356, 357, 358, 359 y 363. La morfología de las células conidiógenas fue en forma de botella con la porción basal ensanchada con un ahusamiento que da origen a un cuello característico (fig. 1h), las dimensiones de las fiálides fueron de $5.5 \times 2.3 \mu\text{m}$ ($4.6 - 6.3 \pm 0.45 \times 1.7 - 2.9 \pm 0.29 \mu\text{m}$, $n = 90$) y los conidios en cadenas de forma cilíndrica a fusiforme (fig. 1i) de $4.5 \times 1.6 \mu\text{m}$ ($4.0 - 5.4 \pm 0.41 \times 1.3 - 2.0 \pm 0.15$, $n = 90$), características acordes con la especie

I. javanica (Gallou et al., 2016). Los análisis filogenéticos individuales por IB de las regiones ITS y TEF de las cepas de *Isaria* spp. mostraron que los aislados CHE-CNRCB 357, 358 y 363 forman parte del clado de *I. javanica* y en el que se incluye el aislado de referencia tipo *I. javanica* CBS 134.22 (fig. 3). Para las 2 regiones, las ramas tienen un apoyo significativo de 100% de PP IB.

Beauveria bassiana. Se recolectaron adultos de *D. citri* infectados con *B. bassiana* en plantas de *M. paniculata* y en huertos de limón en los municipios de Armería y Tecomán, los insectos mostraron crecimiento micelial en el abdomen que se fue tornando polvoso, de coloración blanca a amarillo cremoso (fig. 1j). Se observaron estructuras de reproducción asexual típicas del género, micelio septado con un diámetro de $1.8 \mu\text{m}$ ($1.3 - 2.3 \pm 0.29$, $n = 40$), células conidiógenas de $2.42 \mu\text{m}$ ($1.8 - 3.3 \pm 0.33$, $n = 90$) con una base globosa en forma de botella adelgazadas en la parte superior, formando un raquis curvado en zig-zag que se extiende apicalmente con un conidio por denticulo (fig. 1k); conidios globosos a sub-globosos (fig. 1l) de $2.5 \times 2.2 \mu\text{m}$ ($2.1 - 3 \pm 0.23 \times 1.9 - 2.6 \pm 0.15$, $n = 90$). Cinco aislados fueron obtenidos (i.e., CHE-CNRCB 167, 168, 169, 170 y 365). El análisis filogenético por IB

Tabla 3

Morfometría de *Hirsutella citriformis* a partir de estructuras crecidas sobre *Diaphorina citri* en Colima, México y su comparación con otras investigaciones.

Acrónimo	Fiálide		Conidio	
	Base (largo \times ancho)	Cuello (largo \times ancho)	Largo	Ancho
CHE-CNRCB 331	$6.73 \pm 0.93 \times 4.21 \pm 0.40$	$25.94 \pm 3.55 \times 1.42 \pm 0.20$	6.95 ± 0.78	2.54 ± 0.33
CHE-CNRCB 335	$5.82 \pm 0.69 \times 3.83 \pm 0.31$	$24.61 \pm 3.62 \times 1.2 \pm 0.17$	7.57 ± 0.81	2.18 ± 0.20
CHE-CNRCB 338	$6.47 \pm 0.77 \times 4.3 \pm 0.36$	$28.53 \pm 3.57 \times 1.33 \pm 0.21$	7.2 ± 0.72	$2.6 \pm$
CHE-CNRCB 339	$6.51 \pm 0.82 \times 4.02 \pm 0.40$	$28.84 \pm 3.53 \times 1.07 \pm 0.25$	7.68 ± 0.76	2.30 ± 0.40
CHE-CNRCB 375	$6.08 \pm 0.66 \times 3.88 \pm 0.43$	$29.32 \pm 3.34 \times 1.33 \pm 0.17$	7.36 ± 0.71	2.51 ± 0.32
Estudios comparativos	Base (largo)	Cuello (largo)	-	-
Mains (1951)	6.0 - 14.0	30.0 - 40.0	5.0 - 8.0	2.0 - 2.5
Subandiyah et al. (2000)	5.1 - 9.4	22.4 - 52.9	6.4 - 7.6	2.1 - 2.8
Alvarez et al. (2003)	-	16.8 - 23.6	6.8 - 9.1	1.5 - 2.3
Meyer et al. (2007)	-	17.5 ± 1.9	5.9 ± 0.8	2.6 ± 0.3
Casique-Valdés et al. (2011)	-	-	6.8 - 7.0	1.5 - 2.0
Toledo et al. (2013)	-	28.7 - 47.5	5.9 - 7.9	2.0 - 3.0
Toledo et al. (2013)	-	16.8 - 28.0	5.6 - 7.8	2.2 - 2.8
Pérez-González et al. (2015), Colima	6.00 ± 0.48	24.7 ± 0.84	5.91 ± 0.14	1.79 ± 0.03
Pérez-González et al. (2015), Chiapas	5.12 ± 0.23	26.88 ± 0.19	6.04 ± 0.05	1.99 ± 0.03

derivada de la concatenación de las regiones Bloc, TEF e ITS de las muestras de *Beauveria* spp. mostró que los aislados CHE-CNRCB 167, 168, 169, 170 y 365 forman parte del clado de *B. bassiana* y en el que se incluye el aislado de referencia tipo *B. bassiana* ARSEF 1564. La rama tiene un apoyo fuerte y significativo de 100% de PP IB. Sin embargo, dentro de la especie *B. bassiana* se observaron 2 cladogramas distintos con un apoyo del 100% y del 99% de PP IB, separando los aislados CHE-CNRCB 167, 168 y 365 de los aislados CHE-CNRCB 169, 170 y ARSEF 1564. Esta diferencia genética fue soportada únicamente por la región intergénica nuclear Bloc, la cual fue desarrollada inicialmente para realizar investigaciones de especiación críptica de *B. bassiana* (Rehner et al., 2006) y posteriormente utilizada en un análisis filogenético multilocus para evaluar la diversidad del género *Beauveria* y el estatus taxonómico de sus especies (Rehner et al., 2011). Por ejemplo, la secuencia Bloc del aislado CHE-CNRCB 365 presentó 96% de similitud (1,452/1,510 pb) respecto a la secuencia Bloc del aislado tipo ARSEF 1564 (EF222317), mientras que las secuencias ITS y TEF del mismo aislado presentaron más de 99% de similitud (515/519 pb y 984/986 pb, respectivamente) con las

secuencias ITS (NR_111594) y TEF (HQ880974) del aislado tipo ARSEF 1564. Adicionalmente, el análisis realizado con la herramienta “basic logic alignment tool” (BLAST) en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mostró que la secuencia Bloc del aislado CHE-CNRCB 365 presentó 100% de similitud con la secuencia Bloc del aislado *B. bassiana* ARSEF 1966 (DQ384384), confirmando su identificación como *B. bassiana*. Debido a lo anterior, el contenido de linajes hermanos o como se observa en la figura 4, la presencia de cladogramas dentro de la especie *B. bassiana* sugiere una gran variación intraespecífica que es determinada principalmente por la región intergénica Bloc.

Simplicillium lanosoniveum. La especie se localizó en un huerto de Armería sobre ninfas cubiertas por micelio blanco y de aspecto granuloso (fig. 1m), sin sinemas; al aislado se le asignó el acrónimo CHE-CNRCB 373. Esta especie se caracteriza por presentar fiálides largas y delgadas generalmente solitarias y raramente verticiladas (fig. 1n); las dimensiones de sus fiálides fueron $29.3 \times 1.2 \mu\text{m}$ ($20 - 44 \pm 0.57 \times 0.8 - 1.7 \pm 0.21$, $n = 30$), los conidios cilíndricos se mostraron agregados en cabezas

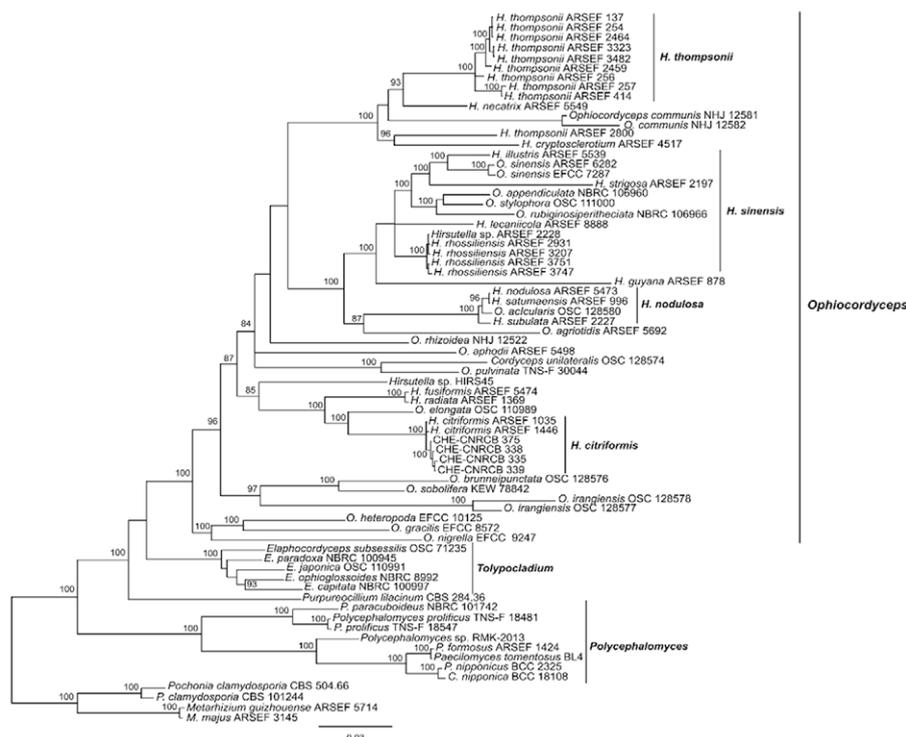


Figura 2. Inferencia bayesiana derivada de la concatenación de las regiones SSU (subunidad pequeña ribosomal), TEF (factor de elongación de traducción 1α) y RPB1 (subunidad 1 de la RNA polimerasa II) (~ 2652 pb) de las cepas CHE-CNRCB 335, 338, 339 y 375. Las probabilidades posteriores (PP) > 80 se señalan en los nodos de cada rama del árbol. Las cepas de referencia proceden de Quandt et al. (2014).

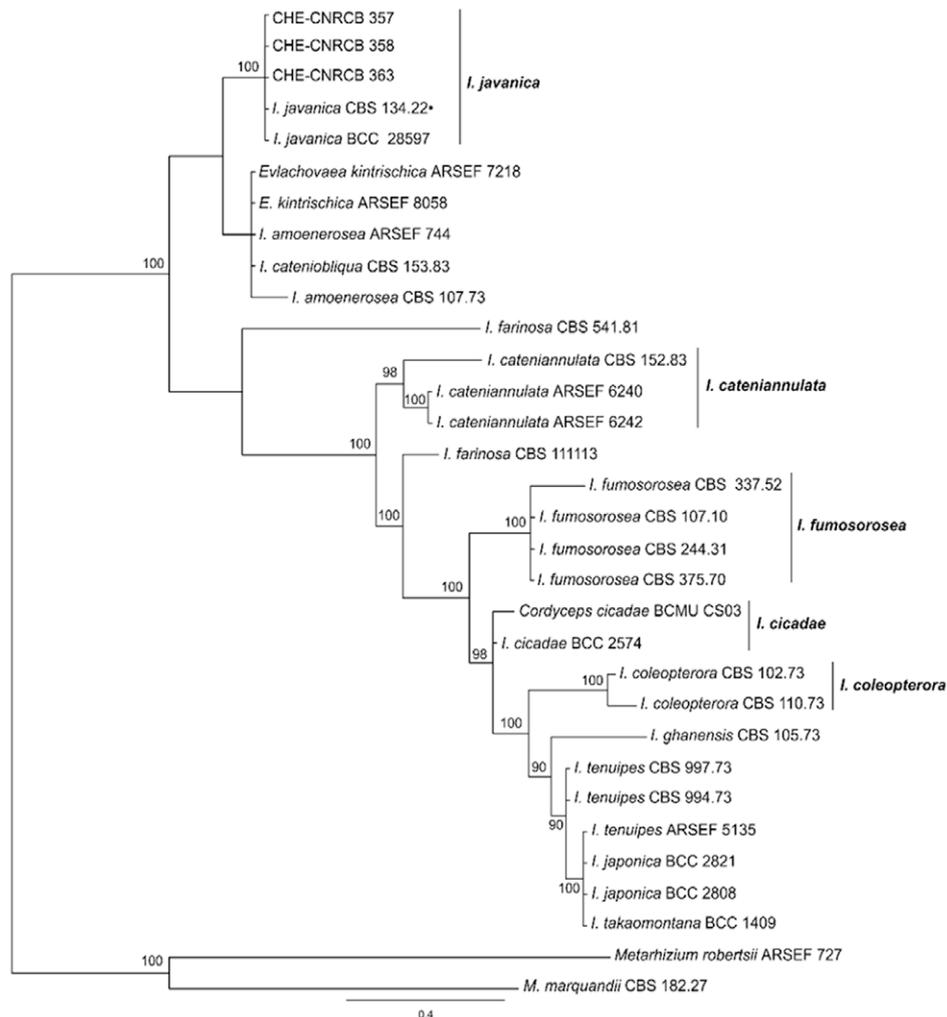


Figura 3. Inferencia bayesiana de la región ITS (espaciadores internos transcritos) (~ 600 pb) de las cepas CHE-CNRCB 357, 358 y 363. Las probabilidades posteriores (PP) > 80 se señalan en los nodos de cada rama del árbol. La cepa de referencia tipo de *Isaria javanica* (Cabanillas et al., 2013) se señala con un (•).

en los vértices de cada fiálide (fig. 1n, o), constituidos por una sola célula de $3.1 \times 1.3 \mu\text{m}$ ($2.4 - 4.3 \pm 0.43 \times 0.9 - 1.6 \pm 0.17$, $n = 30$). El análisis filogenético por IB de la región ITS de la muestra de *Simplicillium* spp. mostró que el aislado CHE-CNRCB 373 forma parte del clado de *S. lanosoniveum* y en el que se incluyen los 2 aislados *S. lanosoniveum* CBS 704.86 y CBS 962.72 (fig. 5). La rama tiene un apoyo significativo de 100% de PP IB.

El género *Batkoa* se encontró sobre ninfas de *D. citri*, el crecimiento del hongo exhibió una textura granulosa dando la apariencia que se encontraba cubierta por azúcar (fig. 6a), con conidios primarios subsféricos con una papila característica de la especie (fig. 6b), con dimensiones de $29.5 \pm 2.5 \mu\text{m}$ de largo \times $24.14 \pm 2 \mu\text{m}$ ($n = 15$) ancho, conteniendo un promedio de 8 núcleos por conidio con un

diámetro de $4.25 \pm 0.67 \mu\text{m}$ ($n = 60$). No se logró aislar este género por lo cual no se realizó el análisis molecular correspondiente.

El género *Entomophthora* fue identificado sobre adultos; las características de los insectos infectados con este hongo fueron abdomen hinchado, las alas extendidas dorso-lateralmente y elevadas por encima del abdomen, con una masa de hifas y conidióforos aglutinados emergiendo a través de las membranas intersegmentales del abdomen y el tórax (fig. 6c). Se observaron conidios primarios con una base plana, rodeada con un halo de mucílago, con punto apical prominente y papila basal amplia (fig. 6d), típicos del género *Entomophthora* (Keller y Dhoi, 2007), con 5 núcleos por conidio con un diámetro de $2.83 \pm 0.32 \mu\text{m}$ ($n = 40$). El promedio de las dimensiones de los

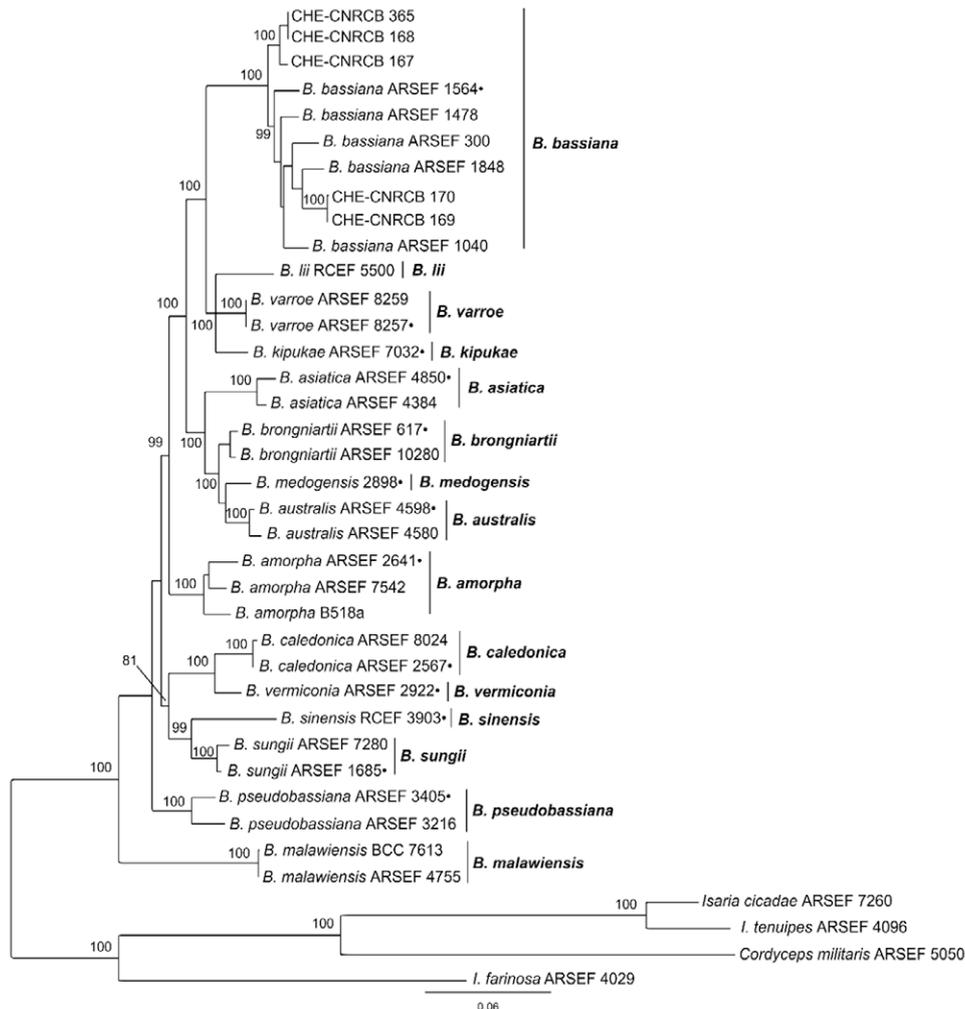


Figura 4. Inferencia bayesiana derivada de la concatenación de las regiones Bloc, TEF (exón del factor de elongación 1- α) e ITS (espaciadores internos transcritos) (~ 3024 pb) de las cepas CHE-CNRCB 167, 168, 169, 170 y 365. Las probabilidades posteriores (PP) > 80 se señalan en los nodos de cada rama del árbol. Las cepas de referencia tipo (Rehner et al., 2011) se señalan con un (*).

conidios primarios fue de $14.59 \mu\text{m} \pm 0.73 \times 11.9 \mu\text{m} \pm 0.61$ ($n = 20$) de largo por ancho respectivamente. No se obtuvieron aislados de este género.

Discusión

En México, se ha reportado a *H. citriformis* infectando a *D. citri* en la mayoría de las zonas cítricas que incluyen Chiapas, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz, Yucatán (Pérez-González et al., 2015), Nuevo León y Tamaulipas (Casique-Valdes et al., 2011). *Hirsutella citriformis* se encontró en todos los huertos muestreados, por lo que fue el hongo con mayor incidencia y distribución en Colima. La presencia de insectos infectados se dio durante los 3 años de recolecta, aunque se observó una

mayor abundancia de septiembre a febrero. Al respecto, Hall, Hentz et al. (2012) reportan mayor abundancia de psílidos micosados con *H. citriformis* en otoño e invierno y afirman que existe una correlación positiva entre la humedad relativa (HR) y la proporción de adultos infectados, cuando esta condición se mantiene estable por 7 días. La infección de *H. citriformis* sobre adultos es más común que en ninfas, durante la exploración se encontraron ninfas micosadas por el hongo en huertos de limón, en la localidad de Coalatilla en Armería. El desarrollo del hongo sobre las ninfas del psílido fue favorecido por un periodo de lluvias intensas que generaron condiciones de alta HR. Estas observaciones coinciden con lo reportado por Étienne et al. (2001), quienes encontraron a *H. citriformis* atacando ninfas y adultos en Guadeloupe, Francia durante

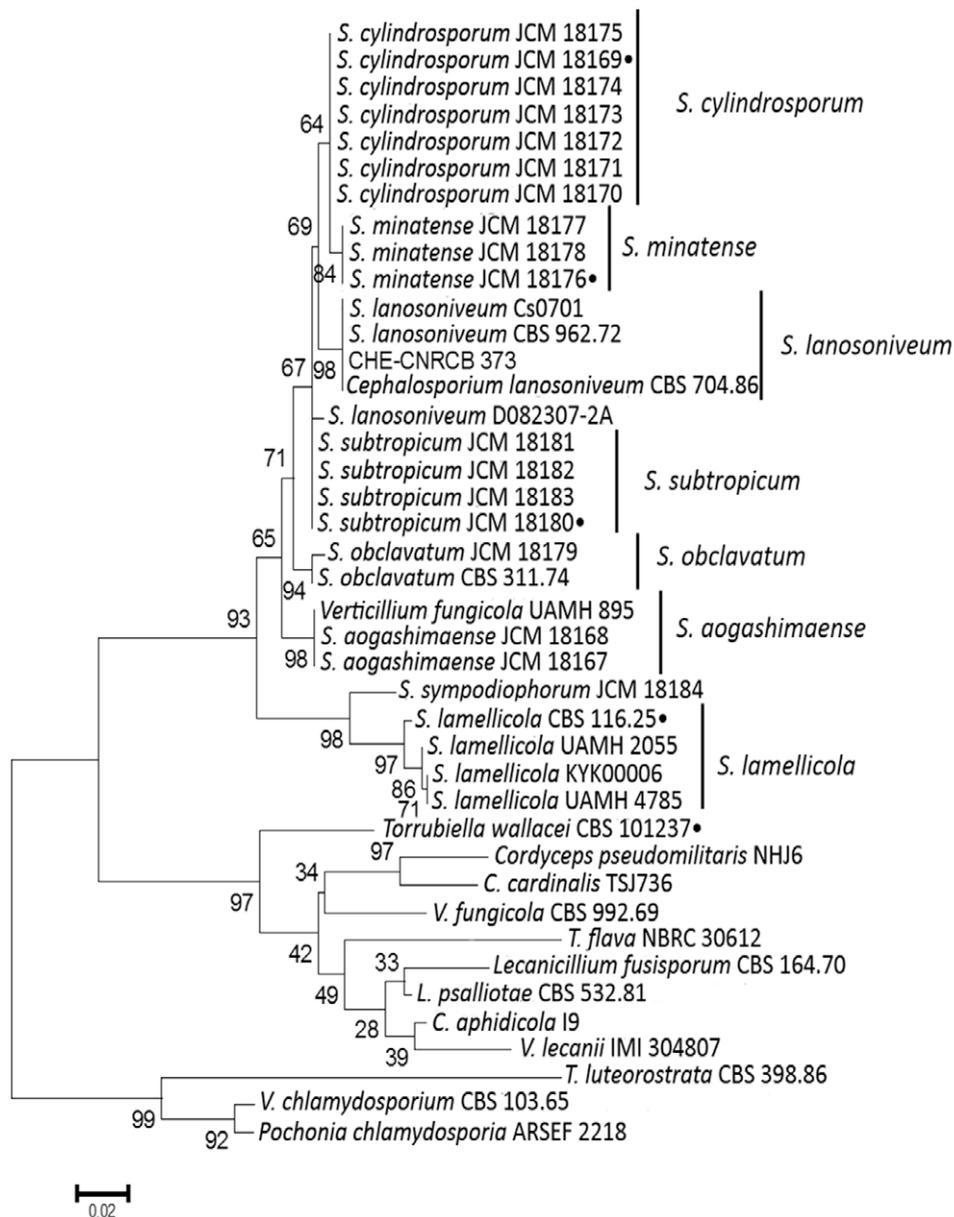


Figura 5. Filograma derivado del método de máxima verosimilitud de la región ITS (~ 600 pb) de la cepa CHE-CNRCB 373. El soporte de las ramas del árbol procedente del análisis de bootstrap con 1,000 réplicas se representa como valor numérico en cada nodo. Las cepas de referencia tipo (Nonaka et al., 2013) se señalan con un (•).

periodos con lluvias intensas provocando una mortalidad de más de 80% de psíidos. Bajo condiciones similares, Álvarez et al. (2003), indican la infección del hongo sobre ninfas de PAC en Jovellanos, Matanzas, Cuba.

La morfometría de los conidios de *H. citrifomis* es similar a la descrita por Mains (1951), Subandiyah et al. (2000), Álvarez et al. (2003), Meyer et al. (2007) y Toledo et al. (2013) (tabla 3); sin embargo, mostró mayores dimensiones conidiales que con otras cepas aisladas en

México reportadas por Pérez-González et al. (2015). Estos autores afirman que los aislados de *H. citrifomis* recolectados en México presentan variabilidad en las dimensiones de sus estructuras.

La presencia de *I. javanica* fue menos abundante, se ubicó únicamente en 2 huertos de limón en Tecomán, en el primero se encontró infectando ninfas, en el segundo sobre adultos. *Isaria fumosorosea* Wize ha sido asociada a *D. citri* en México (Casique-Valdés et al., 2015; Lezama-

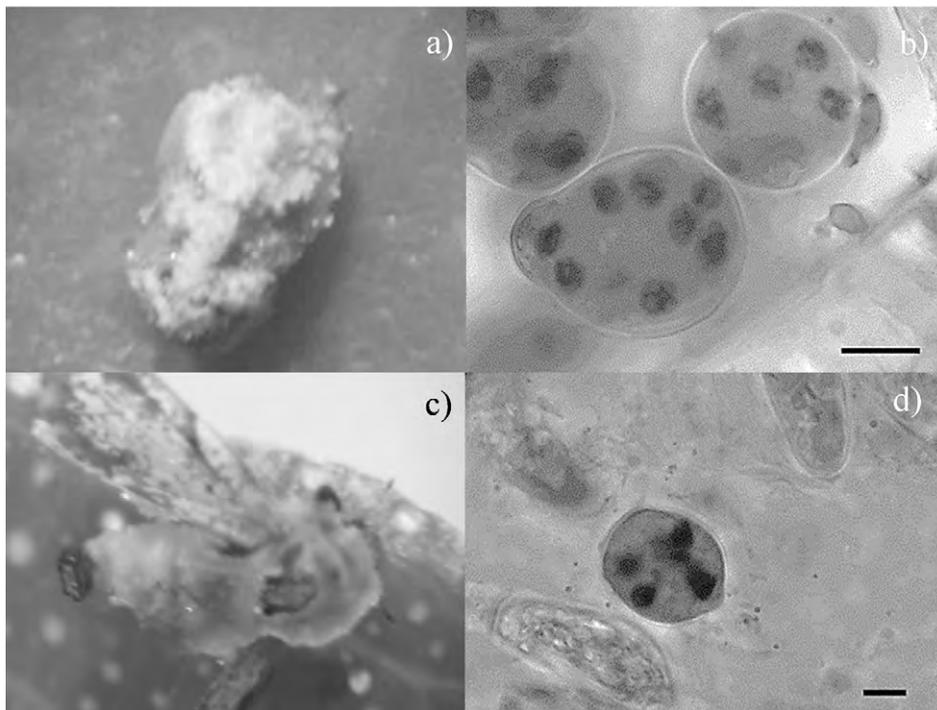


Figura 6. *Diaphorina citri* infectada con Entomophthorales. *Batkoa* sp. sobre ninfa infectada (a) y conidio primario (b). *Entomophthora* sp. en adulto (c) y conidio primario (d). Núcleos teñidos con aceto-orceina. Barra figura (b) = 10 μm y figura (d) = 5 μm .

Gutiérrez et al., 2011) y en otros Países (Subandiyah et al., 2000). Las cepas de *I. javanica* obtenidas en nuestro estudio presentaron estructuras de mayor tamaño a las reportadas para la cepa DCP03 de *I. fumosorosea* cuyas dimensiones para las fiálides son de $4.7 \times 1.9 \mu\text{m}$ y conidios de $2.9 \times 1.4 \mu\text{m}$ (Subandiyah et al., 2000), pero similares a las cepas de *I. javanica* caracterizadas por Gallou et al. (2016).

Aunque *B. bassiana* es una especie que ocasiona infección sobre muchas especies de insectos (Zimmermann, 2007), su presencia fue baja. Lezama-Gutiérrez et al. (2011) encontraron ninfas y adultos de *D. citri* infectados con *B. bassiana* en Colima, mientras que en el presente estudio, solo se hallaron adultos infectados en un huerto de limón y en plantas de limonaria en los municipios de Armería y Tecomán. Igualmente se ha detectado la presencia de este hongo en el estado de Nayarit (Rodríguez-Palomera et al., 2012) en limón persa con bajos porcentajes de infección.

El género *Simplicillium* tiene parentesco con el género *Lecanicillium*, ambos géneros producen fiálides delgadas en forma de espina, conidios que se adhieren en cabezas viscosas mucilaginosas o formando cadenas. *Simplicillium* y *Lecanicillium* se pueden distinguir por la disposición de fiálides, el primero generalmente posee una disposición de fiálides solitarias con poca diferencia entre las hifas,

mientras que este último tiene fiálides verticiladas. Los caracteres morfológicos del aislamiento CHE-CNRCB 373 coinciden con la descripción de *S. lanosoniveum* (Zare y Gams, 2001), en este género se incluyen aislados de diversos artrópodos, otros hongos y suelo (Bałazy et al., 2008; Nonaka et al., 2013; Zare y Gams, 2001). Se reporta por primera vez la presencia de *S. lanosoniveum* sobre *D. citri*.

Los Entomophthorales *Batkoa* sp. y *Entomophthora* sp. fueron detectados sobre ninfas y adultos de *D. citri* respectivamente, este es el primer reporte de *Batkoa* sp. asociado al PAC en Colima, México. Estos géneros se presentaron en los meses de diciembre a febrero cuando las condiciones ambientales son frescas por la mañana con presencia de rocío. Los 2 géneros fueron identificados solo morfológicamente ya que no fue posible su aislamiento. Las características morfométricas de *Batkoa* sp. se confirmaron considerando las dimensiones reportadas por Keller y Dhoi (2007) y para *Entomophthora* sp. la forma de campana del conidio primario, número de núcleos y las dimensiones concuerdan con la descripción de Keller (2007). Los conidios primarios (CP) y sus núcleos presentaron dimensiones similares a la espora de *Entomophthora philippinensis* Villacarlos y Wilding (CP:

11.5 - 20.5 × 9 - 18.5 μm; con 2 - 6 núcleos de 2 - 4.5 × 2 - 3.5 μm) reportado infectando al psílido de la leucaena, *Heteropsylla cubana* Crawford, en las Filipinas (Villacarlos y Wilding 1994), y más pequeños que los reportados sobre *D. citri* (CP: 16.6 × 22.7 μm) en Veracruz, México (Guízar-Guzmán y Sánchez-Peña, 2013). Los insectos infectados con *Batkoa* sp. se encontraron en un solo huerto, mientras que *Entomophthora* sp. estaba presente en huertos de los 3 municipios explorados encontrando pocos insectos infectados por huerto. En algunos de los casos los insectos que inicialmente fueron infectados por *Entomophthora* presentaron estructuras típicas del género *Cladosporium*, lo anterior se evidenció al encontrar insectos con estructuras de los 2 hongos, pero con los síntomas característicos de infección por Entomophthorales, al respecto Guízar-Guzmán y Sánchez-Peña (2013) afirman que el porcentaje de infección causado por *Entomophthora* es posiblemente subestimado por el rápido crecimiento de hongos secundarios. Los hongos del orden Entomophthorales asociados a *D. citri* reportados previamente en México son *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko para Colima (Lezama-Gutiérrez et al., 2011), el cual no fue encontrado en esta búsqueda y *Entomophthora* sp. en el estado de Veracruz (Guízar-Guzmán y Sánchez-Peña, 2013).

Considerando los resultados obtenidos y otros reportes de hongos asociados al PAC en México se cuenta con una gran diversidad de HE. La obtención de aislados de hongos patógenos presentes en las poblaciones de *D. citri* bajo determinadas condiciones ambientales, deben ser consideradas para generar tecnología que en un futuro permita incluir acciones adicionales para el manejo de la plaga como parte del programa de control biológico del PAC implementado por la DGSV. En condiciones naturales se observó a *H. citriformis* con un alto potencial infectivo sobre *D. citri*, lo que sugiere el desarrollo de técnicas para su reproducción masiva; además se requiere desarrollar estrategias para el uso de Entomophthorales con el fin de explotar su potencial como agentes de control de la plaga.

Agradecimientos

Al Dr. Richard A. Humber "Insect Mycologist and Curator" de la "ARSEF Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures" por su apoyo en la identificación de los hongos del orden Entomophthorales. Al personal del Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Colima, a los compañeros de los Departamentos de Hongos Entomopatógenos (DHE- CNRCB) y de Insectos Entomófagos (DIE-CNRCB) por los insectos recolectados en campo proporcionados a la CHE-CNRCB.

Referencias

- Álvarez, J. F., Naranjo, M. O. F. y Grillo, R. H. (2003). Hongos entomopatógenos de *Diaphorina citri* Kirk. (Homoptera; Psyllidae) en Jovellanos, Matanzas. *Centro Agrícola*, 30, 87.
- Amer, O. E., Mahmoud, M. A., El-Samawaty, A. M. A. y Sayed, R. M. (2011). Non liquid nitrogen-based-method for isolation of DNA from filamentous fungi. *African Journal of Biotechnology*, 10, 14337–14341.
- Ayala-Zermeño, M. A., Gallou, A., Berlanga-Padilla, A. M., Serna-Domínguez, M. G., Arredondo-Bernal, H. C. y Montesinos-Matías, R. (2015). Characterisation of entomopathogenic fungi used in the biological control programme of *Diaphorina citri* in Mexico. *Biocontrol Science and Technology*, 25, 1192–1207.
- Balazy, S., Mietkiewski, R., Tkaczuk, C., Wegensteiner, R. y Wrzosek, M. (2008). Diversity of acaropathogenic fungi in Poland and other European countries. *Experimental and Applied Acarology*, 46, 53–70.
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88, 7–37.
- Brlansky, R. H., Chung, K. R. y Rogers, M. E. (2006). Huanglongbing (Citrus Greening), En M. E. Rogers y L. W. Timmer (Eds.), *Florida citrus pest management guide*. (pp. 109–111). University of Florida, IFAS Extension. Recuperado el 08 de mayo, 2017 de: <http://edis.ifas.ufl.edu/CG086>
- Cabanillas, H. E., de León, J. H., Humber, R. A., Murray, K. D. y Jones, W. A. (2013). *Isaria poprawskii* sp. nov. (Hypocreales: Cordycipitaceae), a new entomopathogenic fungus from Texas affecting sweet potato whitefly. *Mycoscience*, 54, 158–169.
- Carbone, I. y Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous Ascomycetes. *Mycologia*, 9, 553–556.
- Casique-Valdés, R., Reyes-Martínez, A. Y., Sánchez-Peña, S. R., Bidochka, M. J. y López-Arroyo, J. I. (2011). Pathogenicity of *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Cordycipitaceae) to *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) and *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Trioizidae). *Florida Entomologist*, 94, 703–705.
- Casique-Valdes, R., Sánchez-Lara, B., Ek-Maas, J., Hernández-Guerra, C., Bidochka, M., Guízar-Guzmán, L. et al. (2015). Field trial of aqueous and emulsion preparations of entomopathogenic fungi against the Asian citrus psyllid (Homoptera: Liviidae) in a lime orchard in Mexico. *Journal of Entomological Science*, 50, 79–87.
- Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Sung, G. H., Hyten, A. S. y Spatafora, J. W. (2004). Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. *Mycological Research*, 108, 864–872.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. y Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.

- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792–1797.
- 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.
- Gallou, A., Serna-Domínguez, M. G., Berlanga-Padilla, A. M., Ayala-Zermeño, M. A., Mellin-Rosas, M., Montesinos-Matías, R. et al. (2016). Species clarification of *Isaria* isolates used as biocontrol agents against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Mexico. *Fungal Biology*, 120, 414–423.
- Goettel, M. S. e Inglis, D. (1997). Fungi: Hyphomycetes. En L. A. Lacey (Ed.), *Manual of techniques in insect pathology* (pp. 213–248). Londres: Academic Press.
- Guízar-Guzmán, L. y Sánchez-Peña, S. R. (2013). Infection by *Entomophthora* sensu stricto (Entomophthoromycota: Entomophthorales) in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Veracruz, Mexico. *Florida Entomologist*, 96, 624–627.
- Hall, D. G., Hentz, M. G., Meyer, J. M., Kriss, A. B., Gottwald, T. R. y Boucias, D. G. (2012). Observations on the entomopathogenic fungus *Hirsutella citrififormis* attacking adult *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in a managed citrus grove. *Biocontrol*, 57, 663–675.
- Hall, D. G., Richardson, M. L., Ammar, E. D. y Halbert, S. E. (2012). Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. Mini review. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 146, 207–223.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Serie*, 41, 95–98.
- Hayek, A. E., Papierok, B. y Eilenberg, J. (2012). Methods for study of the entomophthorales. En L. A. Lacey (Ed.), *Manual of techniques in insect pathology* (pp. 285–314). Londres: Academic Press.
- Hoy, M. A. (1998). Myths, models and mitigation of resistance to pesticides. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Sciences*, 353, 1787–1795.
- Humber, R. A. (2012). Identification of entomopathogenic fungi. En L. A. Lacey (Ed.), *Manual of techniques in insect pathology* (pp. 151–186). Londres: Academic Press.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. y Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30, 3059–3066.
- Keller, S. (2007). Systematics, taxonomy and identification. En S. Keller (Ed.), *Arthropod-pathogenic Entomophthorales: biology, ecology, identification* (pp. 110–132). Luxemburgo: COST Office.
- Keller, S. y Dhoi, G. C. Y. (2007). Insect pathogenic Entomophthorales from Nepal and India. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft. Journal of the Swiss Entomological Society*, 80, 211–215.
- Keremane, M. L., Ramadugu, C., Castaneda, A., Díaz, J. E., Peñaranda, E. A., Chen, J. (2015). Report of *Candidatus Liberibacter caribbeanus*, a new citrus- and psyllid-associated *Liberibacter* from Colombia, South America. American Phytopathological Society (APS). *Annual Meeting, August 1-5, Pasadena California, USA*. Recuperado el 31 de mayo, 2017 de: http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2015_meeting_abstracts/aps2015abO253.htm
- Lezama-Gutiérrez, R., Galván-Gutiérrez, G., Contreras-Bermúdez, Y., Díaz-Flores, S., Reyes-Martínez, G., Barba-Reynoso, M. et al. (2011). Presencia natural y patogenicidad de los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Cordyceps bassiana* (Ascomycetes) en ninfas y adultos de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) en el estado de Colima. En M. Elías-Santos, K. Arévalo-Niño, I. Quintero-Zapata, C. Solís-Rojas, C. F. Sandoval-Coronado, H. A. Luna-Olvera et al. (Eds.), *Memorias del XXXIV Congreso Nacional de Control Biológico* (pp. 90–96). 6-11 noviembre, Monterrey, Nuevo León, México.
- Mains, E. B. (1951). Entomogenous species of *Hirsutella*, *Tilachlidium* and *Synnematium*. *Mycologia*, 43, 691–718.
- Meyer, J. M., Hoy, 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. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95, 101–109.
- Nonaka, K., Kaifuchi, S., Omura, S. y Masumaa, R. (2013). Five new *Simplicillium* species (Cordycipitaceae) from soils in Tokyo, Japan. *Mycoscience*, 54, 42–53.
- Pérez-González, O., Rodríguez-Villareal R. A., López-Arroyo, J. I., Maldonado-Blanco, M. G. y Rodríguez-Guerra, R. (2015). Mexican strains of *Hirsutella* isolated from *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae): morphologic and molecular characterization. *Florida Entomologist*, 98, 111–120.
- Quandt, C. A., Kepler, R. M., Gams, W., Araújo, J. P. M., Ban, S., Evans, H. C. et al. (2014). Phylogenetic-based nomenclatural proposals for *Ophiocordycipitaceae* (Hypocreales) with new combinations in *Tolyposcladium*. *IMA fungus*, 5, 121–134.
- Qureshi, J. A., Kostyk, B. y Stansly, P. A. (2009). Control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) with foliar and soil-applied insecticides. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 122, 189–193.
- Rambaut, A. (2014). FigTree v1.4.2: tree figure drawing tool, disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rehner, S. A. y Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97, 84–98.
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L. y Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103, 1055–1073.
- Rehner, S. A., Posada, F., Buckley, E. P., Infante, F., Castillo, A. y Vega, F. E. (2006). Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93, 11–21.

- Rivero-Aragón, A. y Grillo-Ravelo, H. (2000). Natural enemies of *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) in the central region of Cuba. *Centro-Agrícola*, 27, 87–88.
- Rodríguez-Palomera, M., Cambero-Campos, J., Robles-Bermúdez, A., Carvajal-Cazola, C. y Estrada-Virgen, O. (2012). Natural enemies associated to *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) in *Citrus latifolia* Tanaka, in the state of Nayarit, Mexico. *Acta Zoológica Mexicana (n.s)*, 28, 625–629.
- Ronquist, F. y Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes version 3.0: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–1574.
- Samson, R. A. (1974). *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 6, 1–119.
- Sánchez-González, J. A., Mellín-Rosas, M. A., Arredondo-Bernal, H. C., Vizcarra-Valdez, N. I., González-Hernández A. y Montesinos-Matías, R. (2015). Psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). En H. C. Arredondo-Bernal y L. A. Rodríguez-del Bosque (Eds.), *Casos de control biológico en México*. (pp. 339–372). México D.F.: bba, Colegio de Posgraduados.
- Subandiyah, S., Nlkoh, N., Sato, H., Wagiman, F., Tsyuyuyu, S. y Fukatsu, T. (2000). Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea) in Indonesia. *Mycoscience*, 41, 509–513.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. y Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.
- Toledo, A. V., Simurro, M. E. y Balatti, P. A. (2013). Morphological and molecular characterization of a fungus, *Hirsutella* sp., isolated from planthoppers and psocids in Argentina. *Journal of Insect Science*, 13, 1–11.
- Villacarlos, L. y Wilding, N. (1994). Four new species of Entomophthorales infecting the leucaena psyllid *Heteropsylla cubana* in the Philippines. *Mycological Research*, 98, 53–164.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White (Eds.). *PCR Protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315–322). Nueva York: Academic Press, Inc.
- Xie, P. H., Su, C. y Lin, Z. G. (1988). A preliminary study on an entomogenous fungus (*Verticillium lecanii*) of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hom:Psyllidae). *Chinese Journal of Biological Control*, 4, 92.
- Yang, Y., Huang, M., Beattie, G., Xia, Y., Ouyang, G. y Xiong, J. (2006). Distribution, biology, ecology and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, a major pest of citrus: a status report for China. *International Journal of Pest Management*, 52, 343–352.
- Zare, R. y Gams, W. (2001). A revision of *Verticillium* section Prostrata. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia*, 73, 1–50.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17, 553–596.