

Patogenicidad de cepas de *Fusarium semitectum* BERK. & Ravenel sobre *Diaphorina citri* Kuwayama

Pathogenicity of *Fusarium semitectum* Berk & Ravenel strains on *Diaphorina citri* Kuwayama

Raúl Rodríguez-Guerra^{1*}, J. Isabel López-Arroyo¹, Santos Díaz-Martínez², Kenzy Ivveth Peña-Carrillo¹, Adriana Paola Martínez Camacho³

¹Centro de Investigación Regional Noreste. Campo Experimental General Terán, Km 31 Carretera Montemorelos-China, Hacienda las Anacuas, Gral. Terán, N.L., México. C.P. 67400. ²Colegio de Postgraduados. Centro de Entomología y Acarología. Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. C.P. 56230. ³Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato. Carretera Valle-Huanímaro km. 12, Valle de Santiago, Guanajuato, México.

Resumen

Durante el año 2016 y 2020 se colectaron insectos micosados de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) y *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae), respectivamente. Los hongos aislados son morfológicamente idénticos y corresponden al género *Fusarium*. El objetivo de esta investigación fue identificar y evaluar *in vitro* la patogenicidad de estos hongos sobre adultos de *D. citri*. Además, se evaluó su patogenicidad sobre *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae), depredador de *D. citri*. Se establecieron dos experimentos. Las cepas monoconidiales aisladas de cada especie de insecto se identificaron morfológicamente como *Fusarium semitectum* Berk. & Ravenel. La identidad de la cepa aislada de *D. citri* fue confirmada mediante el análisis de los espaciadores transcritos internos (ITS's) como *F. semitectum* (= *F. incarnatum*, *F. pallidroseum*). La patogenicidad de ambas cepas de *Fusarium* se evaluó utilizando extracto de levadura para su aspersión. El porcentaje de mortalidad de *D. citri* varió de 21.9 a 50.7 % entre ambos experimentos, mientras que ningún ejemplar inoculado de *C. externa* murió o fue micosado. Los resultados

Abstract

During 2016 and 2020, mycosed insects of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) and *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae) were collected, respectively. Isolated fungi were morphologically the same and correspond to the genus *Fusarium*. Identity and *in vitro* pathogenicity of these fungi on *D. citri* adults was evaluated. Two experiments were established. In addition, its pathogenicity was evaluated on *Chrysoperla externa* Hagen (Neuroptera: Chrysopidae), predator of *D. citri*. Monoconidial strains isolated from each insect species were morphologically identified as *F. semitectum* Berk. & Ravenel. Identity of isolated strain of *D. citri* was confirmed by internal transcribed spacers (ITS's) analysis as *F. semitectum* (= *F. incarnatum*, *F. pallidroseum*). Pathogenicity of both strains were evaluated using yeast extract for spraying. For both experiments, mortality percent of *D. citri* ranged from 21.9 to 50.7; while, no inoculated specimens of *C. externa* died or were mycosed. Results showed that *F. semitectum* is a new record of entomopathogenic fungus that parasitizes *D. citri* opportunistically or weakly, and it is harmless to *C. externa*.

mostraron que *F. semitectum* es un nuevo hongo entomopatógeno que parasita a *D. citri* de manera oportunista o débil, y es inocuo a *C. externa*.

Palabras Claves: Psílido asiático de los cítricos, mosca prieta, hongo entomopatógeno.

***Autor para correspondencia:**
rodriguez.raul@inifap.gob.mx

Introducción

El psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) es una plaga que daña directamente los brotes y el follaje de cítricos, y además es el principal transmisor de las bacterias asociadas al huanglongbing (HLB) *Candidatus Liberibacter* spp. (Bové, 2006). El control del insecto se basa en el uso intensivo de plaguicidas (Singerman y Rogers, 2020), con efectos colaterales que generalmente aparecen asociados, como lo son las afectaciones al medio ambiente, riesgos de toxicidad para personas y animales, desarrollo de resistencia a los insecticidas (Pimentel y Burgess, 2014), y disminución drástica de enemigos naturales de esta y otras plagas en el agrosistema, entre otros (Monzó y Stansly, 2015). El uso de microorganismos entomopatógenos es una estrategia complementaria para el control de *D. citri*. Se han identificado diversas especies de hongos sobre esta plaga en México, que incluye a *Entomophthora* sp. (Guizar-Guzmán y Sánchez-Peña 2013), *Beauveria bassiana*, *Hirsutella citriformis* (Casique-Valdes *et al.*, 2011), *Metarhizium anisopliae* (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2014), *Cordyceps (Isaria) fumosorosea* (Wise) (Wise) Kepler, B. Shrestha & Spatafora (Casique-Valdés *et al.*, 2015), *Simplicillium lanosoniveum* y *Batkoa* sp. (Berlanga-Padilla *et al.*, 2018) y sp.

Keywords: Asian citrus psyllid, citrus blackfly, entomopathogenic fungus.

Introduction

The Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) directly damages the shoots and foliage of citrus trees, and it is also the main vector of the bacteria associated with the lethal disease huanglongbing (HLB), *Candidatus Liberibacter* spp. (Bové, 2006). The control of the insect is based on intensive pesticide use (Singerman and Rogers, 2020), with collateral effects that generally appear associated, such as effects on the environment, risks of toxicity for people and animals, development of resistance to insecticides (Pimentel and Burgess, 2014), and a drastic decrease in natural enemies of this and other pests in the agrosystem, among others (Monzó and Stansly, 2015). The use of entomopathogenic microorganisms is a complementary strategy for the control of *D. citri*. Various species of fungi have been identified on this pest in Mexico, which includes *Entomophthora* sp. (Guizar-Guzmán and Sánchez-Peña 2013), *Beauveria bassiana*, *Hirsutella citriformis* (Casique-Valdes *et al.*, 2011), *Metarhizium anisopliae* (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2014), *Cordyceps (Isaria) fumosorosea* (Wise) (Wise) Kepler, B. Shrestha & Spatafora (Casique-Valdés *et al.*, 2015), *Simplicillium lanosoniveum* and *Batkoa* sp. (Berlanga-Padilla *et al.*, 2018) and *Zoophthora radicans* (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2011); the last two fungi have been only registered in Mexico. Also, in 2018 the *Cordyceps javanica* fungus was identified on a *D. citri* mycosed adult (Ou *et al.*, 2018) in a greenhouse in China.

Strains of the species of *C. fumosorosea*, *C. javanica*, *B. bassiana*, *M.*

Zoophthora radicans (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2011), de las cuales las últimas dos sólo se han registrado en México. También, el hongo *Cordyceps javanica* se identificó en 2018 sobre un cadáver adulto de *D. citri* micosado (Ou *et al.*, 2018), en un invernadero en China. Cepas de las especies de *C. fumosorosea*, *C. javanica*, *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *M. brunneum* Petch se han caracterizado por su patogenicidad contra *D. citri*, y se ha demostrado que su capacidad de causar mortalidad y micosamiento es variable entre ellas (Mellín-Rosas *et al.*, 2016; Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2013). La identificación de nuevas cepas y especies que ataquen esta plaga debe incrementar las posibilidades de usar una amplia gama de hongos entomopatógenos en el manejo integrado para su control. Numerosos hongos sobre insectos pueden ocurrir de manera oportunista y su papel como entomopatógenos debe ser evaluada. Durante 2016 se colectaron insectos adultos de *D. citri* micosados provenientes de un invernadero con cítricos del Campo Experimental General Terán (CEGET), y en 2020 ninfas micosadas de mosca prieta de los cítricos, *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae), de una parcela del municipio de General Terán, ambos del estado de Nuevo León, México. El análisis directo de los hongos permitió descartar a los géneros de entomopatógenos previamente encontrados sobre *D. citri*, y fueron identificados como miembros del género *Fusarium*. Con base a que diversas especies de este hongo han sido reconocidas como entomopatógenas de insectos incluyendo hemipteros (O'Donnell *et al.* 2012), el objetivo de esta investigación consistió en identificar y determinar la capacidad patogénica de las cepas de *Fusarium* aisladas contra adultos de *D. citri*, lo que podría permitir incrementar el número de especies de hongos entomopatógenos para el manejo de esta plaga.

Materiales y métodos

anisopliae and *M. brunneum* Petch have been characterized by their pathogenicity against *D. citri*; and their capacity to cause mortality and mycosis has been shown to be variable among them (Mellín-Rosas *et al.*, 2016; Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2013). The identification of new strains and species causing the death of this pest should increase the possibilities for use of a wide range of entomopathogenic fungi for integrated pest management of *D. citri*. Many fungi on insects can occur opportunistically and their role as entomopathogens must be evaluated. During 2016, mycosed adult insects of *D. citri* were collected from a greenhouse with citrus trees at the General Terán Experimental Station (CEGET), and in 2020 mycosed nymphs of the citrus blackfly, *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae) from a citrus orchard in the municipality of General Terán, both in Nuevo León state (N.L.), Mexico. Direct fungi analysis made it possible to rule out the genera of entomopathogens previously reported on *D. citri*, and the isolates were identified as *Fusarium* spp. Based on the fact that various species of this genus have been recognized as entomopathogens of insects including hemipterans (O'Donnell *et al.* 2012), the objective of this research was to identify and determine the pathogenic capacity of the isolated *Fusarium* strains against adults of *D. citri*, which could allow to increase the number of entomopathogenic fungi species for the management of this pest.

Materials and methods

Obtaining strains

Mycosed asian citrus psyllid adults (Figure 1a), collected between September and December 2016 from a CEGET citrus greenhouse, and mycosed nymphs of citrus blackfly collected in January 2020 from a citrus orchard of the Municipality of General Terán, N. L., Mexico, were reviewed under

Obtención de cepas

Adultos micosados del psílido asiático de los cítricos (Figura 1a), colectados entre septiembre y diciembre del 2016 de un invernadero con cítricos del CEGET, N. L., México, y ninfas micosadas de mosca prieta de los cítricos colectadas en enero del 2020 de un huerto de cítricos del municipio de General Terán, N. L., se revisaron bajo microscopio estereoscópico y compuesto, y las características de los hongos correspondieron al género *Fusarium*. A partir de insectos micosados (Figura 1b) se obtuvo una suspensión de conidios, y se dispersó en el medio agar papa dextrosa (PDA) acidificado ($200 \mu\text{L L}^{-1}$ de ácido láctico 85 %) para obtener un cultivo monospórico (Figura 1c). Las cepas monospóricas se transfirieron al medio de cultivo mínimo SNA (Nelson *et al.* 1983; 1.0 g de KH_2PO_4 , 1.0 g KNO_3 , 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g de KCl, 0.2 g de Sacarosa, 0.2 g de glucosa y 20.0 g de agar en un litro de agua), y se encuentran conservadas en agua estéril, en tubos cónicos de 50 mL, a 26°C en el CEGET.

Identificación morfológica.

Las cepas monospóricas se colocaron al centro de cajas Petri con los medios SNA y PDA. La inoculación se realizó con un pequeño fragmento de colonia de las cepas mantenidas en SNA. Las nuevas colonias se revisaron a los 10 y 15 días bajo el microscopio compuesto para su identificación mediante las claves de Nelson *et al.* (1983) y el manual de laboratorio de Leslie y Summerell (2008).

Identificación mediante ITS's.

Debido a que ambas cepas se identificaron morfológicamente como una misma especie de *Fusarium*, sólo la cepa obtenida de *D. citri* fue analizada mediante la

stereoscope and compound microscope, and the characteristics of the fungi corresponded to the genus *Fusarium*. From mycosed insects (Figure 1b) a conidia suspension was obtained, and it was dispersed in the acidified potato dextrose agar (PDA) medium ($200 \mu\text{L L}^{-1}$ of lactic acid 85%) to obtain a monosporic culture (Figure 1c). The monosporic strains were transferred to the SNA minimal culture medium (Nelson *et al.* 1983; 1.0 g of KH_2PO_4 , 1.0 g KNO_3 , 0.5 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g of KCl, 0.2 g of Sucrose, 0.2 g of glucose and 20.0 g of agar in one liter of water). The strains are stored in 50 mL conical tubes with sterile water, at 26°C in CEGET.

Morphological identification

Monosporic strains were placed in the center of Petri dishes with SNA and PDA media. Inoculation was carried out with a small colony fragment of the strains maintained in SNA. New colonies were reviewed at 10 and 15 days under the compound microscope for their identification using the keys of Nelson *et al.* (1983) and Leslie and Summerell's (2008) laboratory manual.

Identification through ITS's

Due to both strains were morphologically identified as the same species of *Fusarium*, only the strain obtained from *D. citri* was analyzed by the sequence of internal transcribed spacers (ITS's). The DNA was extracted with isoamyl phenol chloroform (25: 24: 1), precipitated with sodium acetate (3M; pH 7) and isopropanol, washed with 70% ethanol and suspended in TE. The ITS-1-5.8S-ITS-2 (ITS's) region was amplified by PCR with the primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGAATATGC-3') following the procedure described by Robles-Yerena *et al.* (2010). The sequencing was

secuencia de los espaciadores transcritos internos (ITS'S). El ADN se extrajo con fenol cloroformo isoamílico (25:24:1), se precipitó con acetato de sodio (3M; pH 7) e isopropanol, se lavó con etanol al 70 % y se suspendió en TE. La región ITS-1-5.8S-ITS-2 (ITS's) se amplificó mediante PCR con los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGAATATGC-3') siguiendo el procedimiento descrito por Robles-Yerena *et al.* (2010). La secuenciación se realizó en ambos sentidos en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Las secuencias se alinearon con en el programa MEGA 7.0 utilizando el algoritmo MUSCLE del programa MEGA 7.0, y la secuencia consenso se analizó en la página del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) con el algoritmo megablast.

carried out in both directions at the Potosino Institute for Scientific and Technological Research. The sequences were aligned in the MEGA 7.0 program using the MUSCLE algorithm of the MEGA 7.0 program, and the consensus sequence was analyzed on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) page (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) with the megablast algorithm.

Pathogenicity against Diaphorina citri

Two experiments were performed. In the first, the *Fusarium* strains were grown in PDA medium for 14 days for the production of conidia, and their pathogenicity was evaluated in experimental arena (Pérez-González *et al.* 2015), which consists of placing a Valencia orange leaf on a sponge (5 mL of water) into a bottle (5.5 cm lower diameter, 8 cm upper diameter, 6 cm high) with a plastic lid partially

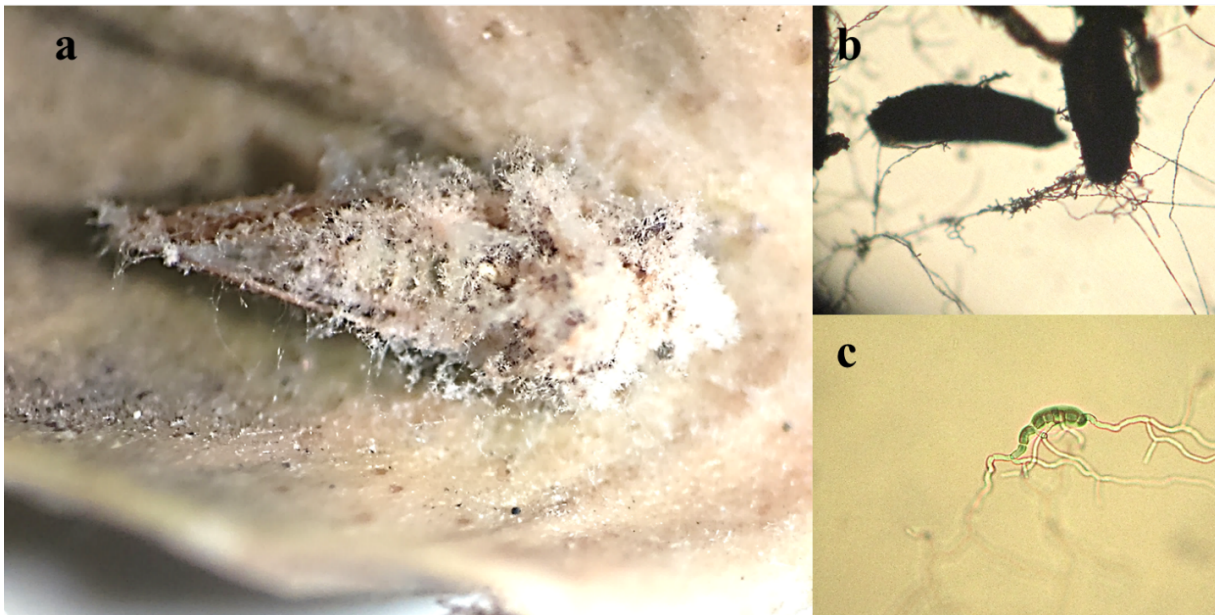


Figura 1. Aislamiento de *Fusarium* sp. a) Adulto micosado de *Diaphorina citri*. b) Fragmento del cuerpo micosado de un adulto de *D. citri*. c) Conidio germinado de *Fusarium* (10X).

Figure 1. Isolation of *Fusarium* sp. a) *Diaphorina citri* mycosed adult. b) Fragment of the mycosed body of an adult of *D. citri*. c) Germinated conidium of *Fusarium* (10X).

Patogenicidad contra Diaphorina citri

Se realizaron dos experimentos. En el primero, las cepas de *Fusarium* se crecieron en el medio PDA por 14 días para la producción de conidios, y evaluar su patogenicidad en arena experimental (Pérez-González *et al.* 2015) que consiste en colocar una hoja de naranjo valencia sobre esponja húmeda (5 mL de agua) dentro de un frasco (5.5 cm de diámetro inferior, 8 cm de diámetro superior, 6 cm de altura) con una tapa de plástico cubierta parcialmente con tela de organza. La concentración de conidios se ajustó a 10^7 mL⁻¹ en una solución de extracto de levadura (0.5 %; Raymundo-Jiménez *et al.*, 2019)), los tratamientos evaluados fueron un testigo con extracto de levadura y una suspensión de conidios de cada cepa en extracto de levadura, los cuales se aplicaron por aspersion. Previo a la aplicación de los tratamientos se determinó la presencia de conidios de las cepas en 20 µL de la suspensión final a aplicar, y en la deposición de conidios en un portaobjetos y un cubreobjetos colocados sobre la esponja de una arena experimental. Se establecieron ocho repeticiones por tratamiento y cada una consistió de 15 adultos de *D. citri*. Los tratamientos se colocaron en una charola que se cubrió con una bolsa de hule y se mantuvieron a 26 °C con un fotoperíodo de 14 hr luz y una humedad relativa de 65 a 75 %.

En el segundo experimento, un fragmento esporulado de cada cepa se inoculó en ocho cajas Petri conteniendo medio PDA y se dispersó con asa de Digralsky, en seguida se colocó un disco de papel filtro Watman #1 y se incubaron por 8 días a 26 °C. Para la inoculación de insectos se extrajeron los discos de papel filtro, se incorporaron a arenas experimentales y se depositaron 15 adultos de *D. citri* por una hora con agitaciones continuas, con el propósito de que las esporas de las cepas se adhirieran al cuerpo de los insectos.

covered with organza cloth. The conidia concentration was adjusted to 10^7 mL⁻¹ in a yeast extract solution (0.5%), the evaluated treatments were a control with yeast extract and a conidia suspension of each strain in yeast extract, which were applied by spraying. Before applying the treatments, the presence of conidia of the strains was determined in 20 µL of the final suspension to be applied and in the deposition of conidia on a slide and a coverslip placed on the sponge of an experimental arena. Eight replicates per treatment were established and each consisted of 15 *D. citri* adults. The treatments were placed in a tray that was covered with a plastic bag and were kept at 26 °C with a photoperiod of 14 hr light and a relative humidity of 65 to 75%.

In the second experiment a sporulated fragment of each strain was inoculated into eight Petri dishes containing PDA medium and dispersed with a Digralsky loop, then a Watman # 1 filter paper disc was placed and incubated for 8 days at 26° C. For the inoculation of insects, filter paper disks were removed, they were incorporated into the experimental arena and 15 adults of *D. citri* were deposited for one hour with continuous agitation, with the purpose that the spores of the strains could be adhere to the body of the insects. Later, the insects were transferred to a new experimental arena containing an orange leaf. The treatments were kept at 26° C with a photoperiod of 14 hr light. Three insects were extracted from a repetition and placed in 100 µL of sterile water to verify the presence of spores of the strains. In addition, three insects were placed in the PDA culture medium to verify the development of colonies of each strain.

Both experiments had a duration of 10 days and every 2 or 3 days the mortality of insects and *Fusarium* mycosis were evaluated. Also, non-mycosed dead insects were placed in a humid chamber to determine the

Posteriormente los insectos se transfirieron a una nueva arena experimental conteniendo una hoja de naranjo. Los tratamientos se mantuvieron a 26 °C con un fotoperíodo de 14 hr luz. De una repetición se extrajeron tres insectos y se colocaron en 100 µL de agua estéril para verificar la presencia de esporas de las cepas. Además, tres insectos fueron colocados en el medio de cultivo PDA para verificar el desarrollo de colonias de cada cepa.

Ambos experimentos tuvieron una duración de 10 días y cada 2 ó 3 días se evaluó la mortalidad de insectos y el micosamiento por *Fusarium*. También, insectos muertos no micosados fueron colocados en cámara húmeda para determinar la aparición del hongo. Se determinó el porcentaje acumulado de mortalidad y micosamiento con base en los insectos inoculados en cada repetición. Para el análisis de varianza se descartó la mortalidad observada al tercer día de la inoculación.

Patogenicidad contra Chrysoperla externa

Simultáneamente en cada experimento de patogenicidad contra *D. citri*, se evaluó la inocuidad de ambas cepas de *Fusarium* contra larvas de primer instar de *C. externa* en el primer experimento y contra larvas del tercer instar en el segundo. La inoculación se realizó usando los métodos de aspersion y contacto de cada experimento, respectivamente. En el primer experimento once larvas (repeticiones) se inocularon individualmente por aspersion en cajas Petri de 60 X 15 y posteriormente se transfirieron a nuevas cajas Petri conteniendo huevos congelados de la palomilla *Sitotroga cerealella* Oliver (Lepidoptera: Gelechiidae).

En el segundo experimento dos grupos de cinco larvas (repeticiones) se colocaron en contacto por una hora con el inóculo de las cepas de *Fusarium* crecidas en discos de papel, y posteriormente se transfirieron individualmente a cajas Petri conteniendo

appearance of the fungus. Cumulative percentage of mortality and mycoses was determined based on the insects inoculated in each repetition. For the analysis of variance, the mortality observed on the third day after inoculation was discarded.

Pathogenicity against Chrysoperla externa

Simultaneously in each pathogenicity experiment against *D. citri*, safety of both *Fusarium* strains was evaluated against larvae of the first instar of *C. externa* in the first experiment and against larvae of the third instar in the second one. Inoculation was performed using the spray and contact methods of each experiment, respectively. In the first experiment 11 larvae (repetitions) were inoculated individually by aspersion in Petri dishes of 60 X 15 and later they were transferred to new Petri dishes containing frozen eggs of *Sitotroga cerealella* Oliver (Lepidoptera: Gelechiidae). In the second experiment, two groups of five larvae (repetitions) were put in contact for one hour with the inoculum of the *Fusarium* strains grown in paper discs, and later they were individually transferred to Petri dishes containing *S. cerealella* frozen eggs. In each experiment, same number of larvae was established as uninoculated controls; each trial lasted 10 days. After inoculation in the second experiment, and in order to determine the presence of *Fusarium* conidia on larvae, an individual from each treatment was transferred to sterile water and observed under the compound microscope; furthermore, one larva from each treatment was placed in PDA culture medium to determine the development of *Fusarium* colonies.

The remaining replicates were maintained under the same conditions as in the first experiment with *D. citri*. In both experiments, larval mortality and mycoses were registered daily. Due to inoculated first

huevos de *S. cerealella*. En cada experimento se estableció igual número de larvas como testigos sin inocular; las observaciones se efectuaron durante todo el período larvario. Después de la inoculación en el segundo experimento, una larva de cada tratamiento se transfirió a agua estéril para determinar bajo el microscopio compuesto la presencia de conidios de *Fusarium*; además, una larva de cada tratamiento se colocó en medio de cultivo PDA para determinar el desarrollo de colonias de *Fusarium*. Las repeticiones restantes se mantuvieron en las mismas condiciones que en el primer experimento con *D. citri*. En ambos experimentos se registró diariamente la mortalidad y micosamiento de larvas. Debido a que las larvas de primer instar inoculadas mudaron, las exuvias se retiraron y se colocaron en el medio PDA para determinar el desarrollo de colonias de *Fusarium*.

Germinación de conidios en insectos inoculados

A las 24 hr de establecido el primer experimento y a las 48 hr del segundo experimento con *D. citri* y *C. externa*, se extrajeron de una repetición 15 y 9 insectos adultos de *D. citri*, respectivamente; mientras que para *C. externa* se extrajo una larva del primer y tercer instar de cada tratamiento. Los insectos extraídos se transfirieron a 5 mL de ácido láctico (85 %) para su transparentación. Ahí se mantuvieron los insectos por 10 días a 56 °C, y posteriormente se extrajeron, se colocaron en un portaobjeto con lactofenol y se agregó 3 µL de lactofenol-azul de algodón antes de cubrir con un cubreobjetos. Los insectos fueron observados al microscopio compuesto y se registró la presencia y germinación de conidios de *Fusarium*.

Resultados

La presencia de mesoconidios en instar

larvae molted, exuviae were collected and placed in the PDA medium to determine the development of *Fusarium* colonies.

Germination of conidia in inoculated insects

At 24 hr after the first experiment and at 48 hr after the second experiment with *D. citri* and *C. externa*, 15 and 9 adult insects of *D. citri* were extracted from a replicate, respectively; while for *C. externa*, a first and third instar larva of each treatment were removed. These insects were transferred to 5 mL of lactic acid (85%) for transparency. The insects were kept there for 10 days at 56° C, and later they were pulled out, placed on a slide with lactophenol and 3 µL of lactophenol-cotton blue was added before covering with a coverslip. The insects were observed under a compound microscope and the presence and germination of *Fusarium* conidia were recorded.

Results

The presence of mesoconidia in monophialides and polyphialides in the aerial mycelium and characteristic macroconidia (Figure 2), as well as the absence of microconidia, and the scarce presence of simple chlamydospores allowed the morphological identification of both strains as *Fusarium semitectum* Berk. & Ravenel. Based on the BLAST analysis of the ITS's sequence, the isolated strain of *D. citri* showed 99 to 100% identity with sequences of *F. incarnatum* (= *F. pallidoroseum*, *F. semitectum*), *F. equiseti* and *F. culmorum* strains.

Prior to the inoculation of *D. citri* in the first pathogenicity experiment, the presence of *Fusarium* conidia was verified in a 20 µL aliquot of the final suspension to be applied, spraying it through the organza cloth of the experimental arena and examining the drops that were deposited on a slide and

monofiálides y polifiálides en el micelio aéreo y macroconidios característicos (Figura 2), así como ausencia de microconidios, y escasa presencia de clamidosporas simples, permitió identificar morfológicamente ambas cepas como *Fusarium semitectum* Berk. & Ravenel. Con base al análisis BLAST de la secuencia de los ITS's, la cepa aislada de *D. citri* mostró 99 a 100 % de identidad con secuencias de cepas de *F. incarnatum* (= *F. pallidoroseum*, *F. semitectum*), *F. equiseti* y *F. culmorum*.

coverslips placed on the bottom of the arena; while, in the second experiment the presence of conidia was confirmed in the bodies of insects inoculated by contact that were suspended in water, and in inoculated insects placed in the PDA medium. The 15 adult insects of *D. citri* from the first experiment, extracted for transparency at 24 hr after spray inoculation, showed germinated conidia of both *Fusarium* strains (Figure 3); the same was observed in the nine individuals extracted

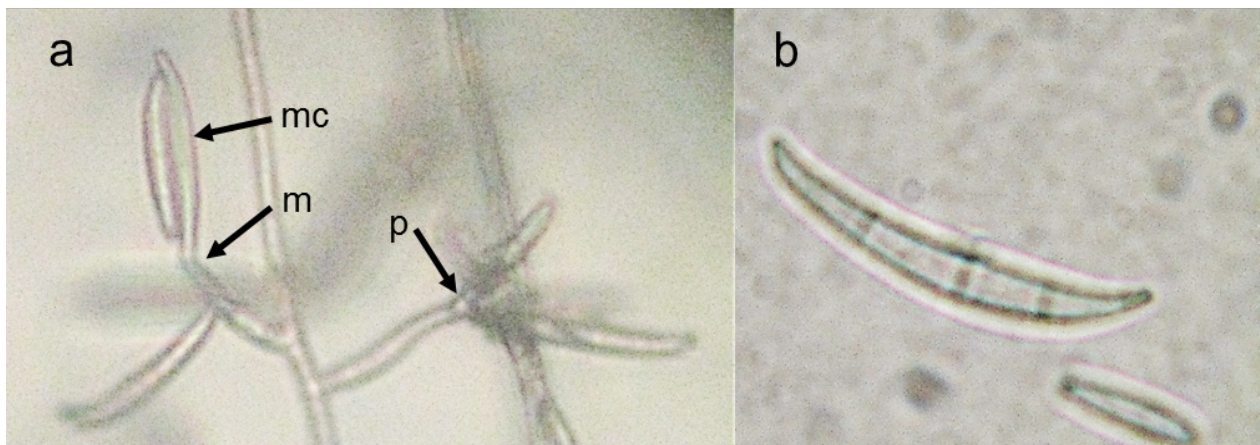


Figura 2. *Fusarium semitectum*. a) Mesoconidios (mc) en monofiálides (m) y polifiálides (p); b) Macroconidio.

Figure 2. *Fusarium semitectum*. a) Mesoconidia (mc) in monophialide (m) and polyphialide (p); b) Macroconidium.

Previo a la inoculación de *D. citri* en el primer experimento de patogenicidad, se verificó la presencia de conidios de *Fusarium* en una alícuota de 20 μ L de la suspensión final a aplicar, en las gotas depositadas sobre un portaobjetos por la aspersion realizada y sobre cubreobjetos colocados dentro de una arena experimental asperjados a través de la tela de organza. Mientras que en el segundo experimento se confirmó la presencia de conidios en los cuerpos de insectos inoculados por contacto que se suspendieron en agua, y en insectos inoculados colocados en el medio PDA. Los 15 insectos adultos de *D. citri* del primer experimento extraídos para su transparentación a las 24 hr después de la

for transparency at 48 hr after contact inoculation in the second experiment; these results showed that both inoculation methods allowed the contact and adhesion of *F. semitectum* conidia in insects.

F. semitectum strains isolated from *D. citri* and *A. woglumi* caused mortality of 50.7% and 47.5% on adults of *D. citri* in the first experiment, respectively; while in the control, death was 39.9% (Figure 4a). In the second experiment the two strains caused mortality of 21.9% and 40.9%, and in the control it was 20.9% (Figure 4b). Only eight and two mycosed insects were observed in adults inoculated with the strains of *Diaphorina* and *Aleurocanthus* in the first

inoculación por aspersión, mostraron conidios germinados de ambas cepas de *Fusarium* (Figura 3), al igual que los nueve extraídos para su transparentación a las 48 hr después de la inoculación por contacto en el segundo experimento. Lo anterior demuestra que ambos métodos de inoculación permitieron el contacto y adhesión de los conidios de *F. semitectum* en los insectos.

experiment.

In the experiment of inoculation by contact of the predator *C. externa*, the occurrence of conidia of each strain of *Fusarium* was verified in insects placed both in water and in culture medium, while in the insects of the control treatment there were not conidia nor colonies of *Fusarium*. From the

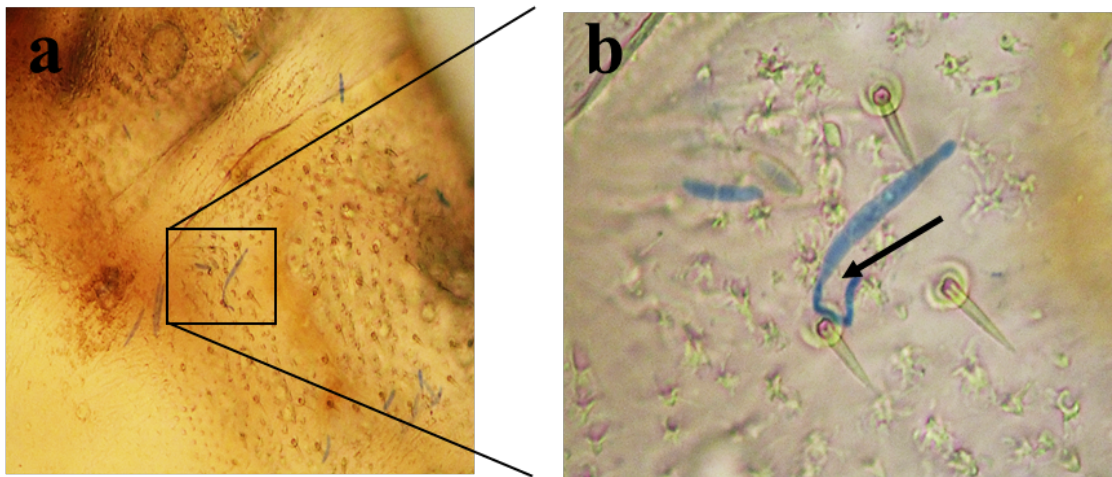


Figura 3. Adulto de *Diaphorina citri* inoculado con *Fusarium semitectum*. a) Imagen del abdomen de un insecto transparentado mostrando dentro del recuadro un conidio germinado del hongo. b) Ampliación del área de recuadro de la imagen “a”, mostrando un conidio germinado de *F. semitectum* a las 24 hr posteriores a la inoculación.

Figure 3. Adult of *Diaphorina citri* inoculated with *Fusarium semitectum*. a) Image of the abdomen of a cleared insect showing a germinated conidium of the fungus inside the box. b) Enlargement of the box area of the image “a” showing a germinated conidium of *F. semitectum* 24 hr after inoculation.

Las cepas de *F. semitectum* aisladas de *D. citri* y *A. woglumi* causaron 50.7% y 47.5% de mortalidad en adultos de *D. citri* en el primer experimento, respectivamente; mientras que en el control fue del 39.9%. (Figura 4A). En el segundo experimento las dos cepas causaron 21.9% y 40.9% de mortalidad, y en el control fue 20.9% (Figura 4B). Sólo se observaron ocho y dos insectos micosados en adultos inoculados con las cepas de *Diaphorina* y *Aleurocanthus* en el primer experimento.

exuviae of the larvae in the treatments of both experiments, the development of *Fusarium* colonies was only observed in exuviae of inoculated insects. In the first spray inoculation experiment, death and mycoses were not observed in inoculated larvae and adults that emerged; however, in the second experiment in which third instar larvae were inoculated by contact, the *F. semitectum* strain obtained from *Diaphorina* produced larval mortality of 21.4%; meanwhile, the isolate obtained from *Aleurocanthus* caused 7.1%;

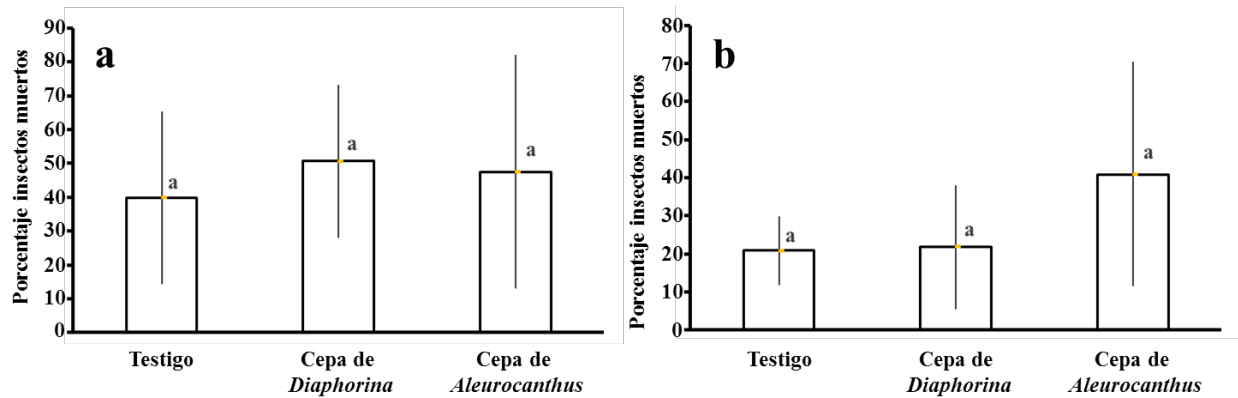


Figura 4. Mortalidad causada por dos cepas de *Fusarium semitectum* sobre adultos de *Diaphorina citri* en el primer experimento (A) y segundo experimento (B) realizados. Letras iguales sobre las barras no difieren entre sí (Tukey, $p \leq 0.05$). Líneas en las barras representan la desviación estándar de los datos ($n=7$).

Figure 4. Mortality caused by two strains of *Fusarium semitectum* on *Diaphorina citri* adults in first (A) and second experiment (B). Equal letters on the bars do not differ from each other (Tukey, $p \leq 0.05$). Lines in the bars represent standard deviation of the data ($n = 7$).

En el experimento de inoculación por contacto de *C. externa* se verificó la ocurrencia de conidios de cada cepa de *Fusarium* en insectos colocados tanto en agua como en medio de cultivo, mientras que en los insectos control no se observaron conidios o colonias de *Fusarium*. A partir de las exuvias de las larvas en los tratamientos de ambos experimentos, sólo se observó desarrollo de colonias de *Fusarium* en exuvias de insectos inoculados. En el primer experimento de inoculación por aspersión no se observó muerte y micosamiento en larvas inoculadas y adultos que emergieron; sin embargo, en el segundo experimento en que larvas del tercer instar se inocularon por contacto, la cepa de *F. semitectum* obtenida de *Diaphorina* produjo mortalidad en 21.4% de larvas, mientras que el aislado obtenido de *Aleurocanthus* causó 7.1% de mortalidad, valor similar al registrado en el tratamiento testigo. Las larvas muertas no se encontraron micosadas.

Discusión

De las especies relacionadas mediante el análisis BLAST con la cepa de *Fusarium* aislada de *D. citri*, sólo las características

meanwhile, the isolate obtained from *Aleurocanthus* caused 7.1% mortality, a similar value to those registered in the control treatment. Dead larvae of *C. externa* did not show any sign of mycoses.

Discussion

Of the species related by BLAST analysis with the isolated *Fusarium* strain of *D. citri*, only the morphological characteristics agree with the morphological description of *F. semitectum* according to Nelson *et al.* (1983) and Leslie and Summerell (2008); however, of these species only *F. culmorum* is not related to the *F. incarnatum-equiseti* species complex (da Silva *et al.*, 2020). Both morphological characteristics and the analysis of the ITS-1-5.6-ITS-2 region made possible to define that the *Fusarium* strains under study correspond to *F. semitectum*. The pathogenicity of numerous species of the genus *Fusarium* isolated from arthropods has been demonstrated on target insects (Ali-Shtayeh *et al.*, 2003; O'Donnell *et al.*, 2012; Sharma and Marques, 2018), and of these only four species of *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. incarnatum*,

morfológicas concuerdan con la descripción morfológica de *F. semitectum* según Nelson *et al.* (1983) y Leslie y Summerell (2008); sin embargo, de estas especies sólo *F. culmorum* no está relacionada al complejo de especies *F. incarnatum-equiseti* (da Silva *et al.*, 2020). Tanto las características morfológicas como el análisis de la región ITS-1-5.6-ITS-2, permiten definir que las cepas de *Fusarium* bajo estudio corresponden a *F. semitectum*. La patogenicidad de numerosas especies del género *Fusarium* aisladas de artrópodos ha sido demostrada sobre insectos blanco (Ali-Shtayeh *et al.*, 2003; O'Donnell *et al.*, 2012; Sharma y Marques, 2018), y de éstas sólo cuatro especies de *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. incarnatum*, *F. semitectum*) se han reportado como patógenas de insectos hemipteros (Torres-Barragán *et al.*, 2004; Mikunthan y Manjunatha, 2006; Aiswariya *et al.*, 2007; Jouda *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014; Anwar *et al.*, 2017).

Los porcentajes de mortalidad observados se consideran bajos respecto a lo reportado para otros hongos entomopatógenos sobre *D. citri*, como *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* (Orduño-Cruz *et al.*, 2015); aunque se ha encontrado que cepas de *F. semitectum* causan una mortalidad de 10 % a 63 % de larvas de *Galleria mellonella* (Ameen, 2012), y cepas identificadas como *F. incarnatum* y *F. incarnatum-equiseti* causan 100 % de mortalidad a *Bemisia tabaci* (Anwar *et al.*, 2017) y 40.3 % en *Matsucoccus matsumurae* (Liu *et al.*, 2014), respectivamente. La presencia de conidios y desarrollo de colonias a partir de insectos inoculados en estos experimentos y los resultados contrastantes con los que se cuentan, deben permitir continuar evaluando éstas y nuevas cepas de *F. semitectum* para establecer su importancia en el control de *D. citri*.

Los bajos porcentajes de mortalidad observados en los estados larvales de *C. F.*

semitectum) have been reported as pathogens of hemipteran insects (Torres-Barragán *et al.*, 2004; Mikunthan and Manjunatha, 2006; Aiswariya *et al.*, 2007; Jouda *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014; Anwar *et al.*, 2017).

The observed mortality percentages are considered low with respect to that reported for other entomopathogenic fungi on *D. citri*, such as *B. bassiana*, *M. anisopliae* and *I. fumosorosea* (Orduño-Cruz *et al.*, 2015); although, it has been reported that strains of *F. semitectum* cause a mortality of 10% to 63% in *Galleria mellonella* larvae (Ameen, 2012), and strains identified as *F. incarnatum* and *F. incarnatum-equiseti* cause 100% mortality of *Bemisia tabaci* (Anwar *et al.*, 2017) and 40.3% in *Matsucoccus matsumurae* (Liu *et al.*, 2014), respectively. The presence of conidia and development of colonies from insects inoculated in these experiments and the contrasting results that are already reported should encourage to continue evaluating these and new strains of *F. semitectum*; results from such studies should contribute to establish the importance of this fungus in the control of *D. citri*.

Low mortality percentages observed in the larval instars of *C. externa* indicate that the strains of *F. semitectum* did not have an important effect on this predator, as it has been previously reported for other entomopathogenic fungi (Mingotti *et al.*, 2020).

In the genus *Fusarium*, 23 species are capable of producing beauvericin (Leslie and Summerell, 2008), a toxic compound against insects, being *F. semitectum* and *F. mononiliforme* var. *subglutinans* species of this genus in which it was first recorded (Gupta *et al.*, 1991).

Although *Fusarium* species that grow on insects can be symbionts, opportunistic pathogens, saprophytes on cadavers or entomopathogens (Sharma and Marques, 2018), some species as *F. semitectum* have

externa indican que las cepas de *F. semitectum* carecen de efecto importante sobre este depredador, tal como ha sido reportado previamente para otros hongos entomopatógenos (Mingotti *et al.*, 2020).

En el género *Fusarium*, 23 especies son capaces de producir beauvericina (Leslie y Summerell, 2008), un compuesto tóxico contra insectos, siendo *F. semitectum* y *F. mononiliforme* var. *subglutinans* las especies de este género en las que se registró por primera vez (Gupta *et al.*, 1991).

Aunque especies de *Fusarium* que crecen sobre insectos pueden ser simbioses, patógenos oportunistas, saprofitos sobre cuerpos muertos o entomopatógenos (Sharma y Marques, 2018), algunas como *F. semitectum* han mostrado ser entomopatógenas sobre varias especies de insectos (Mikunthan y Manjunatha, 2006; Jayasimha *et al.*, 2014). El porcentaje bajo de adultos muertos y micosados de *D. citri*, y el desarrollo en medio de cultivo de colonias de *F. semitectum* a partir de insectos que sobreviven a los 10 días post inoculación, sugieren que esta especie puede ser considerada como un entomopatógeno oportunista o débil contra *D. citri*. No obstante, forma parte de los diferentes enemigos naturales de esta especie que contribuyen a la mortalidad del insecto.

Conclusiones

El estudio constituye el primer registro del hongo *Fusarium semitectum* micosando de manera natural a los insectos plaga de los cítricos *Diaphorina citri* y *Aleurocanthus woglumi*. Este hongo mostró baja mortalidad y micosamiento sobre adultos de *D. citri*, por lo que se considera un hongo entomopatógeno oportunista o débil contra esta plaga. Además, *F. semitectum* es inocuo al depredador de *D. citri*, *C. externa*.

been shown to be entomopathogenic on various species of insects (Mikunthan and Manjunatha, 2006; Jayasimha *et al.*, 2014). Low percentage of dead adults and mycoses of *D. citri*, and the development in culture medium of colonies of *F. semitectum* from insects that survived 10 days after inoculation, suggest that this species can be considered as an opportunistic or weak entomopathogen against *D. citri*; however, it is part of the different natural enemies of this species that contribute to the mortality of the insect.

Conclusions

This study constitutes the first record of the fungus *Fusarium semitectum* naturally mycosing the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, and the citrus blackfly, *Aleurocanthus woglumi*. Due to the fungus showed low mortality and mycoses on adults of *D. citri*, it is considered as an opportunistic or weak entomopathogenic fungus against this pest. Furthermore, *F. semitectum* is harmless to *Chrysoperla externa*, predator of *D. citri*.

Acknowledgments

INIFAP is thanked for the funds to carry out this study under project No. 14552634812. We also thank Raul Gutiérrez Carmona, Erika Soto Cuellar, Alberto Calderón Ruiz, and Yesenia Yazmín Salazar Mata for their diverse help in the bioassays and maintenance and care of the insects under study.

References

Agradecimientos

Se agradece al INIFAP por los fondos para efectuar el presente estudio bajo el proyecto No. 14552634812. También damos las gracias a Raul Gutiérrez Carmona, Erika Soto Cuellar, Alberto Calderón Ruiz, y Yesenia Yazmín Salazar Mata por ayuda diversa en los bioensayos y mantenimiento y cuidado de los insectos bajo estudio.

Referencias

- Aiswariya, K.K., Manjunatha, M. and Naik, M.I. (2007). Evaluation of fungi *Fusarium semitectum* Berk. and Ravenel and *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas against spiraling whitefly *Aleurodicus dispersus* Russell on guava. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 20: 283-287.
- Ali-Shtayeh, M.S., Mara'i, A.B.B. and Jamous, R.M. (2003). Distribution, occurrence and characterization of entomopathogenic fungi in agricultural soil in the Palestinian area. *Mycopathologia*, 156: 235-244.
- Ameen, M.K.M. (2012). Screening of *Fusarium* isolates pathogenicity in vitro by using the larvae of *Galleria mellonella* L. *Journal of Basrah Researches (Sciences)*, 38: 19-28.
- Anwar, W., Haider, M.S., Shahid, A.A., Mushtaq, H., Hameed, U., Rehman, M.Z.U. and Iqbal, M.J. (2017). Genetic diversity of *Fusarium* isolated from members of Sternorrhyncha (Hemiptera): entomopathogens against *Bemisia tabaci*. *Pakistan Journal of Zoology*, 49: 639-645.
- Berlanga-Padilla, A.M., Gallou, A., Ayala-Zermeño, M.A., Serna-Domínguez, M.G., Montesinos-Matías, R., Rodríguez-Rodríguez, J.C. and Arredondo-Bernal, H.C. (2018). Hongos entomopatógenos asociados a *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en Colima, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89: 986-1001.
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: A destructive, newly emerging, century old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88: 7-37.
- Casique-Valdes R., Reyes-Martinez, A.Y., Sanchez-Peña, S.R., Bidochka, M.J. and Lopez-Arroyo, J.I. (2011). Pathogenicity of *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Cordycipitaceae) to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Florida Entomologist*, 94: 703-705.
- Casique-Valdés, R., Sánchez-Lara, B.M., Ek-Maas, J., Hernández-Guerra, C., Bidochka, M., Guízar-Guzmán, L., López-Arroyo, J.I. and Sánchez-Peña, S.R. (2015). Field trial of aqueous and emulsion preparations of entomopathogenic fungi against the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae) in a lime orchard in Mexico. *Journal of Entomological Science*, 50: 79-87.
- da Silva S.A.C., Diniz, A.G., Tiago, P.V. and de Oliveira, N.T. (2020). Entomopathogenic *Fusarium* species: a review of their potential for the biological control of insects, implications and prospects. *Fungal Biology Reviews*, 34: 41-57.
- Gandarilla-Pacheco, F.L., Galán-Wong, L.J., López-Arroyo, J.I., Rodríguez-Guerra, R. and Quintero-Zapata, I. (2013). Optimization of pathogenicity tests for selection of native isolates of entomopathogenic fungi isolated from citrus growing areas of México on adults of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *Florida Entomologist*, 96: 187-195.
- Guizar-Guzmán, L. and 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.
- Gupta, S., Krasnoff, S.B., Underwood, N.L., Renwick, J.A.A. and Roberts, D.W. (1991). Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Mycopathologia*, 115: 185-189.
- Jayasimha, G.T., Rachana, R.R. and Manjunatha, M. (2014). Evaluation of fungal pathogen, *Fusarium semitectum* Berk. and Ravenel against okra leafhopper, *Amrasca biguttula biguttula* Ishida under laboratory and greenhouse conditions. *Trends in Biosciences*, 7: 3561-3564.

- Jouda, G., Monia, B.H.K. and Naima, B. (2010). First report of aphidopathogenic fungi *Fusarium semitectum* (Berkeley and Ravenel, 1875) and *Fusarium sacchari* (Butler and Hafiz Khan) Gams (1971) on *Capitophorus elaeagni* (Del Guercio) (Hemiptera: Aphididae). African Journal of Agricultural Research, 5: 290-293.
- Leslie, J.F. and Summerell, B.A. (2008). The *Fusarium* laboratory manual. John Wiley and Sons. Iowa. 388 p.
- Lezama-Gutiérrez, R., Galván-Gutiérrez, G., Contreras-Bermudes, Y., Díaz-Flores, S., Reyes-Martínez, G., Barba-Reynoso, M., Angel-Sahagún, C.A., Arredondo-Bernal, H.C., Sánchez-González, J.A. y Rebolledo-Domínguez, O. (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: Memorias del XXXIV Congreso Nacional de Control Biológico. 2011. p. 90-96.
- Lezama-Gutiérrez, R., Ramírez-Mancilla, A., Castrejón-Agapito, H., Peralta-Manzo, J.J. y Rebolledo-Domínguez, O. (2014). Uso de *Metarhizium anisopliae* y *Cordyceps bassiana* (Ascomycetes) para el control de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) en Limón Mexicano. Entomología Mexicana, 1: 219-224.
- Liu, W., Xie, Y., Dong, J., Xue, J., Zhang, Y., Lu Y. and Wu, J. (2014). Pathogenicity of three entomopathogenic fungi to *Matsucoccus matsumurae*. PLOS ONE, 9(7), e103350.
- Mellín-Rosas, M.A., Sánchez-González, J.A., Cruz-Ávalos, A.M., Montesinos-Matías, R., and Arredondo-Bernal, H.C. (2016). Patogenicidad de Cepas de Hongos Entomopatógenos sobre *Diaphorina citri* Kuwayama en condiciones de laboratorio. Southwestern Entomologist, 41: 791-800.
- Mikunthan, G. and Manjunatha, M. (2006). Pathogenicity of *Fusarium semitectum* against crop pests and its biosafety to non-target organisms. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 71: 465-473.
- Mingotti, D. P., de Souza, L.E., Amorim, P.L.G., Reis, D.G.L., Bárbaro, B.J.G., Macali, W.A., Aparecido, N.A. and Teodoro, P.E. (2020). Selectivity of entomopathogenic fungi to *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). Insects, 11, 716.
- Monzó, C. and Stansly, P.A. (2015). Thresholds for vector control and compatibility with beneficial fauna in citrus with high incidence of Huanglongbing. Acta Horticulturae, 1065: 1137-1143.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University. University Park, Pennsylvania, USA. 193 p.
- O'Donnell, K., Humber, R.A., Geiser, D.M., Kang, S., Park, B., Robert, V.A.R.G., Crouse, P.W., Johnston, P.R., Aoki, T., Rooney, A.P. and Rehner, S.A. (2012). Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via *Fusarium*-ID and *Fusarium* MLST. Mycologia, 104: 427-445.
- Orduño-Cruz, N., Guzmán-Franco, A.W., Rodríguez-Leyva, E., Alatorre-Rosas, R., González-Hernández, H. and Mora-Aguilera, G. (2015). *In vivo* selection of entomopathogenic fungal isolates for control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). Biological Control, 90: 1-5.
- Ou, D., Zhang, L.H., Guo, C.F., Chen, X.S., Ali, S. and Qiu, B.L. (2019). Identification of a new *Cordyceps javanica* fungus isolate and its toxicity evaluation against Asian citrus psyllid. MicrobiologyOpen, 8, e00760.
- Pérez-González, O., Rodríguez-Villarreal, R.A., López-Arroyo, J.I., Maldonado-Blanco, M.G. and Rodríguez-Guerra, R. (2015). Mexican strains of *Hirsutella* isolated from *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae): Morphologic and molecular characterization. Florida Entomologist, 98: 290-297.
- Pimentel, D., and Burgess, M. (2014). Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States, pp. 48-71. In: D. Pimentel and R. Peshin (eds.) Integrated pest management.

Pesticide Problems, Vol. 3. Springer. New York.

- Raymundo-Jiménez, R., García-Ibarra, E., López-Arroyo, J.I., Ramírez-Cabral, N.Y.Z. y Rodríguez-Guerra, R. 2019, Producción y germinación de conidios del hongo entomopatógeno *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Ophiocordycipitaceae), *Scientia Fungorum*, vol. 49, e1221.
- Robles-Yerena, L., Rodríguez-Villarreal, R.A., Ortega-Amaro, M.A., Fraire-Velázquez, S., Simpson, J., Rodríguez-Guerra, R. and Jiménez-Bremont, J.F. (2010). Characterization of a new fungal antagonist of *Phytophthora capsici*. *Scientia Horticulturae*, 125: 248-245.
- Sharma, L. and Marques, G. (2018). *Fusarium*, an entomopathogen—A myth or reality? *Pathogens*, 7, 93.
- Singerman, A. and Rogers, M.E. (2020). The economic challenges of dealing with citrus greening: The case of Florida. *Journal of Integrated Pest Management*, 11: 1–7.
- Torres-Barragán, A., Anaya, A.L., Alatorre, R. and Toriello, C. (2004). Entomopathogenic fungi from 'El Eden' Ecological Reserve, Quintana Roo, Mexico. *Mycopathologia*, 158: 61-71.