



Universidad Austral de Chile

Conocimiento y Naturaleza

**Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre el
crecimiento radial y la formación de estructuras reproductivas
de cepas chilenas de *Hirsutella citriformis***

Patrocinante: Sr. Cristian Montalva

Trabajo de Tesina presentado como parte
de los requisitos para optar al título de:
Ingeniero(a) en Conservación de Recursos Naturales

ROCÍO ANTONIA BURGOS IBÁÑEZ

VALDIVIA

2026

	Índice de materias	página
i.	Calificación del comité de titulación	i
ii.	Agradecimientos	ii
iii.	Resumen	iii
1	INTRODUCCIÓN	1
2	MÉTODOS	5
2.1	Preparación y cultivo de las cepas fúngicas	5
2.2	Ensayo fisiológico	7
2.2.1	Evaluación del crecimiento de las cepas	7
2.2.2	Evaluación de estructuras reproductivas	7
2.3	Análisis de datos	8
3	RESULTADOS	9
3.1	Crecimiento radial de ambas cepas y características macroscópicas	9
3.2	Efecto de la humedad relativa	14
3.3	Formación de sinemas y concentración final de conidias	14
4	DISCUSIÓN	16
5	CONCLUSIÓN	20
6	REFERENCIAS	20
Anexos	1. Origen geográfico y hospederos de las cepas de <i>Hirsutella citriformis</i>	25
	2. Estructuración ensayo	25
	3. Diámetro promedio registrado por cepa por tratamiento cada 6 días de medición. Expresados en promedio $\pm$ EE (mm).	26
	4. Pruebas estadísticas para el análisis de crecimiento al día 60	27
	5. Registro cepa LSB 1 al día 60 con formación de (a) sinemas, (b) fiálides y (c) conidias.	29

Calificación del comité de titulación

	Nota
Patrocinante: Sr. Cristian Montalva R.	6,9
Informante: Srta. Pamela Cárcamo M.	6,8
Informante: Sr. Esteban Gallardo P.	6,7

El Patrocinante acredita que el presente Trabajo de Titulación cumple con los requisitos de contenido y de forma contemplados en el Reglamento de Titulación de la Escuela. Del mismo modo, acredita que en el presente documento han sido consideradas las sugerencias y modificaciones propuestas por los demás integrantes del Comité de Titulación.



Sr. Cristian Montalva

Agradecimientos

Me gustaría agradecer, en primer lugar, a mi familia, especialmente a mis padres, Paulina y José, por su apoyo incondicional en mi decisión de estudiar lejos de casa, en una ciudad que no conocía y sin saber con certeza lo que me esperaba. Gracias por confiar en mí, en mis capacidades y por acompañarme durante todo este proceso.

Agradezco también a mi hermano José, por enseñarme la importancia de la seriedad en los propósitos, especialmente en aquellos momentos en que sentí que perdía el rumbo. A mi hermano menor, Joaquín, por sus preguntas insaciables e interminables, que tantas veces me recordaron la curiosidad y la simpleza de aprender. A Diego, por su contención, su cálida compañía, su amor incondicional, y especialmente su apoyo en este estudio.

Agradezco profundamente haber encontrado en esta ciudad y en esta carrera a mis amigas y amigos, mi familia valdiviana, con quienes compartí risas, llantos, amor y, sobre todo, apañe durante estos años de estudio lejos de casa y de crecimiento personal. Sin ellas y ellos, este proceso habría sido mucho más difícil.

También quiero agradecer al Laboratorio de Salud de Bosques y a mi comisión evaluadora, por ser guías constantes y presentes en esta investigación. A mi profesor patrocinante, Cristian Montalva, por confiarme este tema, por su paciencia y apoyo a lo largo de este proceso. A Esteban Gallardo, por tener siempre la disposición de ayudarme y por los conocimientos entregados. Y a Pamela Cárcamo, por su consejo acertado y por ayudarme a mirar desde otros puntos de vista aspectos que no siempre había contemplado.

Resumen

Los hongos entomopatógenos constituyen un componente relevante del manejo integrado de plagas, debido a que pueden regular naturalmente poblaciones de insectos y otros artrópodos, además de representar una alternativa de menor impacto ambiental frente al uso exclusivo de insecticidas químicos. Dentro de este grupo, *Hirsutella citriformis* ha sido estudiada principalmente por su asociación con *Diaphorina citri*, vector del huanglongbing en cítricos. Sin embargo, su aplicación práctica continúa limitada por su lento crecimiento, baja producción de conidias, sensibilidad a factores ambientales y dificultades para su producción y formulación. En Chile, el conocimiento sobre cepas nativas de *H. citriformis* aún es incipiente, por lo que resulta necesario avanzar en la caracterización de sus requerimientos fisiológicos bajo condiciones controladas.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de tres temperaturas (5, 15 y 25°C) y dos condiciones de humedad relativa ($70 \pm 2\%$ HR y 99-100% HR) sobre el crecimiento radial y la formación de estructuras reproductivas de dos cepas chilenas de *H. citriformis* (LSB 1 y LSB 21), cultivadas en PDA durante 60 días. El crecimiento fue medido cada seis días y analizado mediante un ANOVA factorial y prueba de Tukey. Los mayores diámetros coloniales se observaron a 25°C, seguidos por los cultivos incubados a 15°C, mientras que a 5°C no se registró crecimiento radial adicional al disco inicial. La temperatura y la cepa tuvieron efectos significativos sobre el crecimiento micelial, mientras que la humedad relativa no presentó un efecto significativo. Además, la interacción cepa $\times$ temperatura fue significativa, indicando una respuesta diferencial entre aislamientos. La formación de sinemas se observó principalmente en LSB 1 a 25°C, con mayor abundancia bajo $70 \pm 2\%$ HR. Estos resultados indican que la temperatura fue el principal factor asociado al crecimiento radial de las cepas chilenas de *H. citriformis* y evidencian diferencias fisiológicas entre aislamientos, especialmente en la respuesta a temperaturas intermedias y en la formación de estructuras reproductivas.

Palabras clave: *Hirsutella*, aislamientos, cultivos, temperatura, humedad, crecimiento, estructuras reproductivas.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos (HE) son microorganismos capaces de infectar, colonizar y causar la muerte de insectos, ácaros y otros invertebrados, por lo que cumplen un rol ecológico importante como agentes de mortalidad natural y, al mismo tiempo, constituyen una herramienta de interés para el manejo integrado de plagas (Casique-Valdés *et al.* 2011, Vega *et al.* 2012, Bamisile *et al.* 2021, Gielen *et al.* 2024). A diferencia de muchos patógenos microbianos que requieren ser ingeridos por el hospedero, numerosos HE infectan por contacto: las conidias (esporas asexuales) se adhieren a la cutícula, germinan, penetran mediante presión mecánica y enzimas hidrolíticas, colonizan internamente al insecto y, bajo condiciones ambientales favorables, emergen para producir nuevas estructuras infectivas (Hajek 1997, Vega *et al.* 2012). Esta capacidad de iniciar la infección desde la superficie externa del hospedero explica su importancia en programas de control biológico, especialmente cuando se busca reducir la dependencia de insecticidas químicos y avanzar hacia estrategias más compatibles con la salud ambiental (Hajek 1997, Bamisile *et al.* 2021).

Dentro de este grupo, *Hirsutella* (Hypocreales, Ophiocordycipitaceae), corresponde a un conjunto de hongos entomopatógenos, acaropatógenos y nematófagos, el cual está asociado principalmente a invertebrados (Seifert y Boulay 2004, Pérez-González 2015, Quesada-Sojo y Rivera-Méndez 2016). Sus especies han sido reportadas desde regiones tropicales, subtropicales y templadas, y se caracterizan por presentar crecimiento lento, micelio hialino a amarillento-grisáceo y baja producción de conidias en comparación con otros hongos entomopatógenos de uso más frecuente, como *Beauveria bassiana* Bassi y *Metarhizium anisopliae* Metchnikoff (Mains 1951, Minter y Brady 1980, Seifert y Boulay 2004, Pérez-González 2015, Quesada-Sojo y Rivera-Méndez 2016).

Desde el punto de vista taxonómico, el género *Hirsutella* ha sido históricamente complejo. Fue descrito originalmente por Patouillard y posteriormente reinterpretado por Speare (1920) como un hongo entomopatógeno imperfecto. Más tarde, Mains (1951) y Minter y Brady (1980) ampliaron su delimitación incorporando especies sinematosas y mononematosas. Actualmente, bajo el principio de 'un hongo, un nombre', muchas especies *hirsutella*-like se entienden como morfos asexuales vinculados a *Ophiocordyceps* u otros linajes de Hypocreales (Sung *et al.* 2007, Quandt *et al.* 2014). No obstante, el uso de *Hirsutella* sigue siendo frecuente en estudios aplicados y taxonómicos, especialmente cuando se describen morfos asexuales con fiálides alargadas que producen conidias inmersas en una matriz mucilaginoso (Simmons *et al.* 2015, Qu *et al.* 2018, Qu *et al.* 2021, Xie *et al.* 2025).

Esta complejidad implica que caracteres como la presencia o ausencia de sinemas, la forma de las fiálides, la disposición de las células conidiógenas y la producción de conidias deben interpretarse

con cuidado, ya que pueden variar entre especies, cepas, condiciones de cultivo y desarrollo sobre el hospedero (Hodge 1998, Seifert y Boulay 2004, Qu *et al.* 2018, Zhang *et al.* 2026).

En este trabajo se mantiene el uso de *Hirsutella citriformis* Speared debido a que corresponde al nombre empleado en la literatura aplicada y en la caracterización previa de las cepas conservadas en el Laboratorio de Salud de Bosques. Esta decisión permite mantener continuidad con los antecedentes disponibles, sin desconocer la discusión nomenclatural actual asociada a *Ophiocordyceps* y a los hongos *hirsutella*-like.

H. citriformis ha recibido especial interés por su estrecha asociación con el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri* Kuwayama), vector del huanglongbing (HLB o “dragón amarillo”), una de las enfermedades más dañinas para los árboles de cítricos a nivel mundial (Quesada-Sojo y Rivera-Méndez 2016). *H. citriformis* es, hasta la fecha, el único representante en su género reportado parasitando *D. citri*, produciendo momificación del hospedero y formación de sinemas, estructuras que pueden actuar como fuente de inóculo para nuevas infecciones (Meyer *et al.* 2007, Casique-Valdés *et al.* 2011, Hall *et al.* 2012, Pérez-González *et al.* 2022).

En terreno, se han observado epizootias naturales de *H. citriformis* asociadas a condiciones ambientales favorables, principalmente en escenarios con alta humedad y presencia sostenida del hospedero. Hall *et al.* (2012) reportaron que, en un huerto de cítricos en Florida USA, adultos de *D. citri* momificados por *H. citriformis* podían permanecer adheridos a las hojas durante periodos prolongados y cubiertos por sinemas en distinto grado de desarrollo. Estos antecedentes son relevantes porque muestran que la interacción hongo-hospedero no depende solo de la patogenicidad del aislamiento, sino también de la persistencia del inóculo, la humedad del microambiente, la temperatura, la densidad del hospedero y las prácticas de manejo del cultivo.

Aunque *D. citri* es el hospedero más estudiado, *H. citriformis* también ha sido registrada en otros hemípteros de importancia agrícola, entre ellos *Melanoliarus dimidiatus*, *Leptopharsa constricta*, *Perkinsiella saccharicida* y *Bactericera cockerelli* (Casique-Valdés *et al.* 2011, Pérez-González *et al.* 2022). Estos registros refuerzan su interés como agente de control biológico, pero también muestran que su desempeño debe evaluarse caso a caso, ya que la susceptibilidad del hospedero, la formación de sinemas y la producción de conidias pueden variar.

Desde el punto de vista morfológico, *H. citriformis* presenta micelio septado, fino e hialino, fiálides con base ensanchada y cuello largo y delgado, que produce una conidia de forma alantoide, cimbiforme o fusiforme comúnmente descritas como similares a un gajo de naranja, la cual suele estar rodeada por una matriz mucilagínosa soluble en agua (Pérez-González 2015). En especies de *Hirsutella*, se ha demostrado que el mucílago conidial puede aumentar la tolerancia a estrés ambiental, mejorar la

adhesión a superficies y favorecer la patogenicidad, por lo que no debe considerarse solo un carácter morfológico, sino también un rasgo funcional (Seifert y Boulay 2004, Meyer *et al.* 2007, Toledo *et al.* 2008, Pérez-González 2015, Quesada-Sojo y Rivera-Méndez 2016, Qu *et al.* 2017, Pérez-González *et al.* 2022).

Se cree que es originaria de Asia, debido a su estrecha relación con *D. citri*, mientras que los primeros reportes de su presencia fueron registrados en Nueva Zelanda, Hawái e India (Speare 1920, Petch 1923 citado en Pérez-González 2015). Su dispersión hacia otras regiones geográficas probablemente ha ocurrido mediante el movimiento de sus insectos hospederos, asociado al comercio internacional de productos agrícolas, principalmente por vía marítima (Pérez-González 2015, Pérez-González *et al.* 2022). Actualmente, se encuentra establecida en zonas tropicales y subtropicales de América y Asia, incluyendo Indonesia, México, Estados Unidos, Argentina, Colombia y Cuba (Subandiyah *et al.* 2000, Toledo *et al.* 2008, Pérez-González 2015, Pérez-González *et al.* 2022, Restrepo-García *et al.* 2024). Esta amplia distribución sugiere una asociación importante con insectos hemípteros, sin embargo, no implica que todas las poblaciones o aislamientos presenten los mismos requerimientos fisiológicos ni el mismo potencial para la producción de inóculo.

A pesar de su alto potencial como agente de control biológico, la implementación práctica de *H. citriformis* presenta limitaciones importantes. Entre las más relevantes se encuentran su lento crecimiento, germinación lenta, baja producción de conidias y dificultades para mantener la viabilidad de los propágulos durante almacenamiento y aplicación. Por ello, estudios recientes han evaluado medios enriquecidos, fuentes proteicas, extracto de levadura, sustratos sólidos y formulaciones con gomas orientadas a mejorar la producción, germinación y vida útil de las conidias (Raymundo-Jiménez *et al.* 2019, Méndez-González *et al.* 2022, Flores-Villarreal *et al.* 2023, Cantú-Bernal *et al.* 2023).

Entre los factores ambientales, la temperatura y la humedad relativa son especialmente relevantes para el desarrollo de *H. citriformis*. Estudios previos han indicado que esta especie presenta un mayor crecimiento radial a temperaturas cercanas a 25°C, mientras que temperaturas superiores o inferiores al rango favorable pueden reducir la velocidad de crecimiento, la producción de estructuras reproductivas o la eficacia infectiva (Meyer *et al.* 2007, Pérez-González 2015, Pérez González *et al.* 2015, Quesada-Sojo y Rivera-Méndez 2016). La humedad relativa, por su parte, resulta fundamental para la eficacia y supervivencia de los hongos entomopatógenos, ya que valores superiores al 80 % son esenciales tanto para la germinación, adhesión, infección, persistencia de conidias y desarrollo de epizootias naturales (Hajek 1997, Hall *et al.* 2012, Pérez-González 2015, Pérez-González *et al.* 2022).

Además de la temperatura y la humedad, la radiación ultravioleta, la luz, la composición del medio, la disponibilidad de nutrientes y el tipo de propágulo pueden afectar el desempeño de los hongos

entomopatógenos, reduciendo la viabilidad de sus esporas. En *Hirsutella*, algunos estudios han mostrado que la oscuridad o regímenes específicos de luz pueden modificar el crecimiento, la conidiación o la formación de sinemas, lo que justifica evaluar las respuestas fisiológicas bajo condiciones controladas antes de avanzar hacia producción masiva o ensayos de patogenicidad (Hajek 1997, Seifert y Boulay 2004).

La mayor parte de los antecedentes disponibles sobre *H. citriformis* proviene de aislamientos asociados a *D. citri* en regiones tropicales y subtropicales. En estos trabajos, los ensayos *in vitro* y de patogenicidad suelen desarrollarse a temperaturas cercanas a 25-26 °C y bajo humedad relativa alta o saturada, debido a que tales condiciones favorecen la infección y la expresión de estructuras reproductivas del hongo (Meyer *et al.* 2007, Casique-Valdés *et al.* 2011, Hall *et al.* 2012, Pérez-González 2015). Sin embargo, estos antecedentes no permiten establecer con claridad cómo responden las cepas chilenas frente a temperaturas más bajas, ni si la humedad saturada favorece necesariamente el crecimiento radial o la esporulación en ausencia del hospedero.

Estos antecedentes son particularmente relevantes para Chile, donde el conocimiento sobre *Hirsutella* sigue siendo limitado. El primer reporte nacional correspondió a un adulto de *Vespula vulgaris*, plaga invasora y nociva, colectado en la Región de Los Lagos e infectado naturalmente por un hongo identificado como *Hirsutella* sp. Aunque en ese caso no fue posible obtener cultivo puro ni confirmar la especie, el registro demostró la presencia del género en el sur del país (Montalva *et al.* 2017). Posteriormente, prospecciones en las regiones de Los Ríos y Los Lagos permitieron obtener aislamientos de seis cepas fúngicas, entre ellas *H. citriformis*, las cuales se encuentran actualmente conservadas en el cepario del Laboratorio de Salud de Bosques (Manríquez Avello 2023).

Las cepas chilenas de *H. citriformis* utilizadas en este estudio provienen de ambientes templados lluviosos del sur de Chile, distintos de los sistemas tropicales y subtropicales donde esta especie ha sido estudiada con mayor frecuencia. De acuerdo con la clasificación climática de Köppen-Geiger, gran parte de esta zona corresponde a climas templados húmedos, con influencia oceánica y precipitaciones distribuidas durante buena parte del año (Peel *et al.* 2007). En este contexto, registros climáticos del año 2018 indican que Valdivia presentó una temperatura media anual de 11,4 °C, con una mínima media de 5,6 °C y una máxima media de 17,1 °C, mientras que en Puerto Montt se registró una temperatura media anual de 10,5°C, una mínima media de 5,9 °C y una máxima media de 15°C (Dirección Meteorológica de Chile 2019).

En este escenario, no es suficiente asumir que los resultados obtenidos con aislamientos de México, Estados Unidos, Colombia u otros países son directamente extrapolables a cepas chilenas. La variabilidad entre aislamientos puede expresarse en crecimiento, esporulación, tolerancia ambiental,

producción de estructuras reproductivas y patogenicidad, como se ha observado en *H. citriformis* y en otras especies del género (Tigano *et al.* 2006, Pérez-González *et al.* 2015, Qu *et al.* 2018, Pérez-González *et al.* 2022).

Por lo tanto, estudiar el efecto de la temperatura y la humedad relativa sobre el crecimiento y la formación de estructuras reproductivas de cepas chilenas de *H. citriformis* permite generar información básica sobre su ecofisiología. Esta información es necesaria antes de avanzar hacia estudios de producción masiva, formulación, conservación de inóculo o evaluación de patogenicidad sobre potenciales hospederos de interés agrícola o forestal en Chile.

La comparación entre 5, 15 y 25°C permite representar un gradiente térmico que incluye una condición baja, una intermedia y una cercana al rango reportado como favorable para la especie. Del mismo modo, la comparación entre una humedad cercana a $70 \pm 2\%$ HR y una condición saturada de 99-100% HR permite evaluar si el aumento de humedad favorece el crecimiento micelial y la formación de estructuras reproductivas bajo condiciones controladas, sin la presencia del hospedero. En este marco, el objetivo general de esta tesis fue evaluar el efecto de diferentes temperaturas y condiciones de humedad relativa sobre el crecimiento radial y la formación de estructuras reproductivas de cepas chilenas de *H. citriformis* bajo condiciones controladas.

Los objetivos específicos de este trabajo son los siguientes:

1. Evaluar el efecto de tres temperaturas (5, 15, 25°C) sobre el crecimiento radial de las cepas chilenas LSB 1 y LSB 21 de *H. citriformis*.
2. Determinar el efecto de dos condiciones de humedad relativa ($70 \pm 2\%$ y 99-100% HR) sobre el crecimiento micelial y la formación de estructuras reproductivas de ambas cepas.
3. Analizar la interacción entre cepa, temperatura y humedad relativa sobre el crecimiento micelial al día 60 de incubación.
4. Comparar el desempeño fisiológico entre ambas cepas chilenas y discutir su respuesta en relación con antecedentes disponibles para *H. citriformis* y otros hongos *hirsutella*-like.

2. MÉTODOS

2.1 Preparación y cultivo de las cepas fúngicas

Se evaluaron dos cepas chilenas de *H. citriformis* (LSB 1 y LSB 21), previamente aisladas desde insectos recolectados en las regiones de Los Ríos y Los Lagos, respectivamente. La cepa LSB 1 proviene

de un díptero colectado en Valdivia, mientras que LSB 21 fue aislada desde un coleóptero asociado a *Gonipterus platensis* en el sector La Poza, Puerto Montt (figura 1, Anexo 1). Ambas cepas se encuentran preservadas en el cepario del Laboratorio de Salud de Bosques de la Universidad Austral de Chile y forman parte de un conjunto de aislamientos previamente caracterizados mediante rasgos morfológicos y marcadores ribosomales.

Para la reactivación de las cepas, se realizaron cultivos en medio Agar Papa Dextrosa (PDA), compuesto por (g/ litro de agua destilada) polvo de papa (300 g), glucosa (20 g) y agar (15 g). Este medio fue utilizado tanto para la reactivación como para el desarrollo del ensayo fisiológico, considerando antecedentes obtenidos con las mismas cepas (Manríquez Avello 2023). Los cultivos fueron incubados a 24 ± 1 °C, en oscuridad, durante 20 días, hasta obtener colonias activas, con crecimiento visible y libres de contaminación.

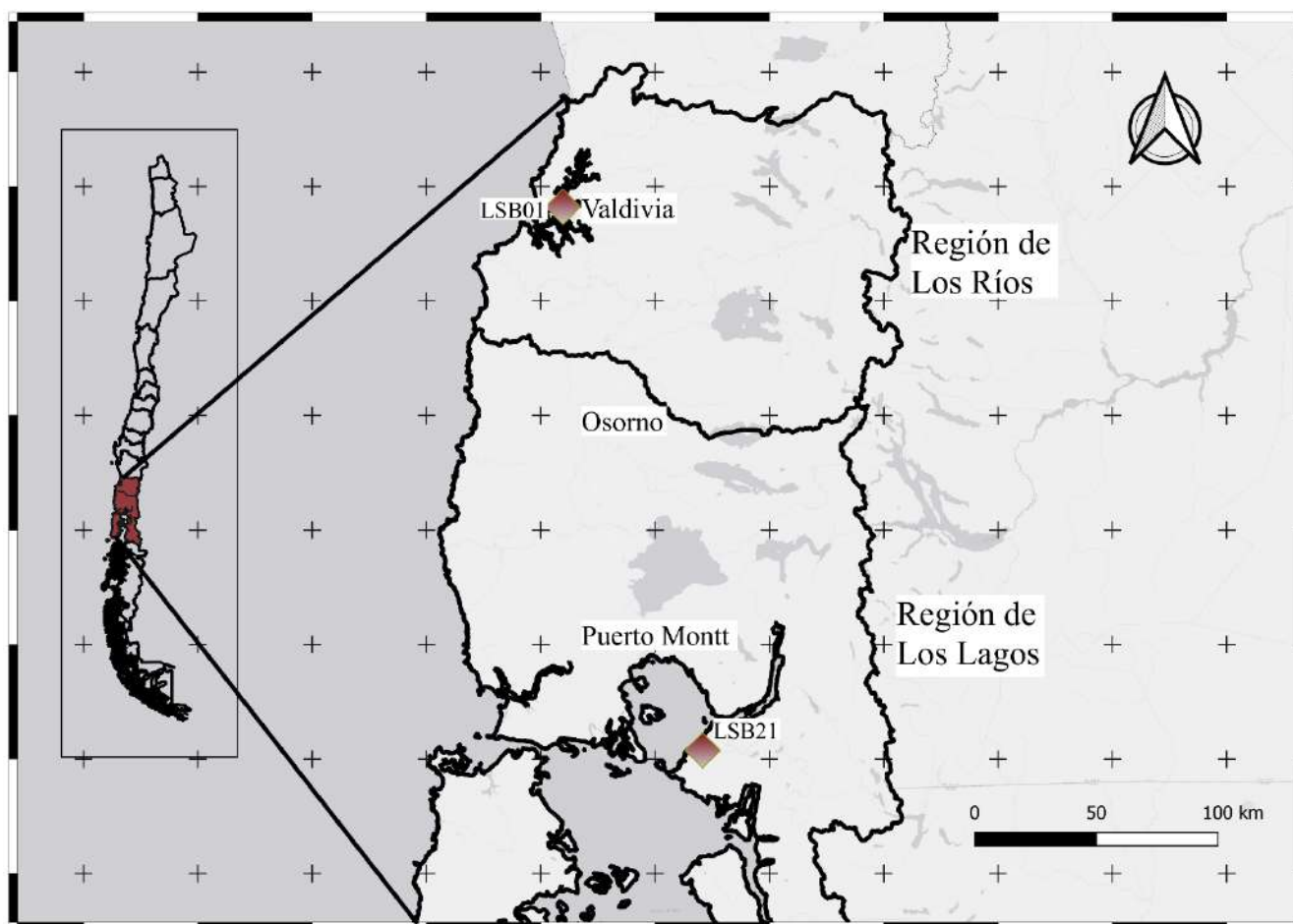


Figura 1. Localidades de puntos de colecta de las cepas nativas de *Hirsutella citriformis* en el sur de Chile (Elaboración propia).

2.2 Ensayo fisiológico

Desde la periferia activa de los cultivos madre de ambas cepas, y utilizando un sacabocado estéril, se obtuvieron discos de PDA con micelio de 4 mm de diámetro. Cada disco fue depositado en el centro de una placa Petri plástica de 90 × 15 mm con medio PDA. Para cada cepa se utilizaron 42 placas, distribuidas en un diseño factorial compuesto por tres temperaturas de incubación y dos condiciones de humedad relativa, con siete repeticiones por combinación de tratamiento.

Las placas fueron rotuladas e incubadas bajo tres regímenes de temperatura (5°C, 15°C, 25°C) en cámaras ambientales programables (modelos FOC 2001 L y FOC 215 E). En cada temperatura se evaluaron dos condiciones de humedad relativa: una condición cercana a $70 \pm 2\%$ HR, correspondiente a la humedad ambiental de la incubadora, y una condición de humedad saturada de 99-100% HR, generada mediante cajas plásticas cerradas con agua estéril en su interior. Todas las placas fueron incubadas en oscuridad durante el periodo experimental (Anexo 2).

2.2.1 Evaluación del crecimiento de las cepas

El crecimiento radial se midió en cada placa Petri cada seis días durante un período de 60 días. Para ello, las placas se marcaron con dos ejes perpendiculares, registrándose el crecimiento radial del cultivo a lo largo del eje horizontal (X) y vertical (Y) mediante una regla milimetrada. Ambas mediciones fueron promediadas para obtener un valor por placa. Los resultados se expresaron en milímetros (mm) y fueron resumidos como promedio $\pm$ error estándar para cada cepa, temperatura y condición de humedad relativa.

Adicionalmente, los datos de crecimiento fueron representados gráficamente para visualizar la evolución del diámetro colonial en función del tiempo, la temperatura y la humedad relativa. Estos gráficos fueron elaborados utilizando la librería plotly en RStudio (Posit team 2025).

2.2.2 Evaluación de estructuras reproductivas

La formación de estructuras reproductivas fue evaluada mediante observación macroscópica de las placas. A partir del día 42 de incubación, y hasta el día 60, las placas fueron revisadas día por medio para registrar la presencia o ausencia de sinemas, el número de sinemas por placa, el momento aproximado de aparición y la condición de incubación en la que se observaron. Para la cuantificación se consideraron únicamente sinemas mayores a 2 mm de altura.

La concentración de conidias fue evaluada al día 60 de incubación. Para ello, se seleccionaron placas por cepa y tratamiento, considerando siete placas por cepa en los tratamientos a 25°C y cinco placas por cepa en los tratamientos a 15°C. En las placas sin sinemas, el micelio de la totalidad de la placa fue removido con una espátula metálica estéril y transferido a un tubo Eppendorf de 1 mL con agua destilada estéril y Tween 80 al 0,1 %. En las placas que presentaron sinemas, estas estructuras fueron retiradas cuidadosamente con pinzas estériles y procesadas en un tubo Eppendorf independiente, mientras que el micelio restante fue procesado por separado.

A cada tubo se agregaron cinco perlas de silicato de circonio para favorecer el desprendimiento de conidias. Posteriormente, las muestras fueron agitadas en vortex durante 3 minutos antes del conteo.

La concentración de conidias se estimó con cámara de Neubauer. Se tomaron 340 μ L de suspensión con una micropipeta y se depositaron cuidadosamente en la cámara, que fue observada al microscopio con un aumento de 40x. El recuento se realizó sumando el total de conidias presentes en los 25 cuadrantes centrales. Este procedimiento se repitió dos veces por muestra y se calculó un promedio, que fue multiplicado por el factor de cámara correspondiente (10^4) para estimar la concentración final de conidias por mililitro.

2.3 Análisis de datos

Los datos de crecimiento micelial al día 60 fueron sometidos a análisis estadístico. En primer lugar, se verificaron los supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Debido a que el tratamiento de 5°C generó valores cercanos al diámetro inicial, los resultados estadísticos fueron interpretados en conjunto con la descripción de los promedios por tratamiento.

El análisis estadístico se realizó utilizando el diámetro colonial final al día 60 como variable de respuesta, debido a que el interés principal fue comparar la respuesta acumulada de crecimiento entre tratamientos. Aunque las colonias fueron medidas cada seis días, estas mediciones se usaron de forma descriptiva para representar la trayectoria de crecimiento. Para el análisis inferencial, cada placa Petri aportó un único valor final y fue considerada una unidad experimental independiente. Por esta razón, se utilizó un ANOVA factorial, ya que los factores evaluados correspondieron a efectos fijos del diseño experimental.

Para evaluar el efecto de la cepa, la temperatura, la humedad relativa y sus interacciones sobre el crecimiento radial al día 60, se aplicó un ANOVA factorial considerando como factores fijos la cepa, la temperatura y la humedad relativa. Posteriormente, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de

Tukey HSD ($\alpha = 0,05$). Todos los análisis estadísticos y gráficos fueron realizados en RStudio. La formación de sinemas y la concentración de conidias fueron analizadas de forma descriptiva, debido a que estas estructuras no se presentaron en todos los tratamientos ni en ambas cepas.

3. RESULTADOS

3.1 Crecimiento radial de ambas cepas y características macroscópicas

El crecimiento radial de las cepas LSB 1 y LSB 21 de *H. citrifomis* varió principalmente en función de la temperatura de incubación. En ambas cepas, los mayores diámetros coloniales se registraron a 25°C, mientras que a 15°C el crecimiento fue menor y a 5°C las colonias se mantuvieron cercanas al diámetro inicial del disco de micelio. Este patrón fue consistente bajo ambas condiciones de humedad relativa evaluadas (Anexo 3).

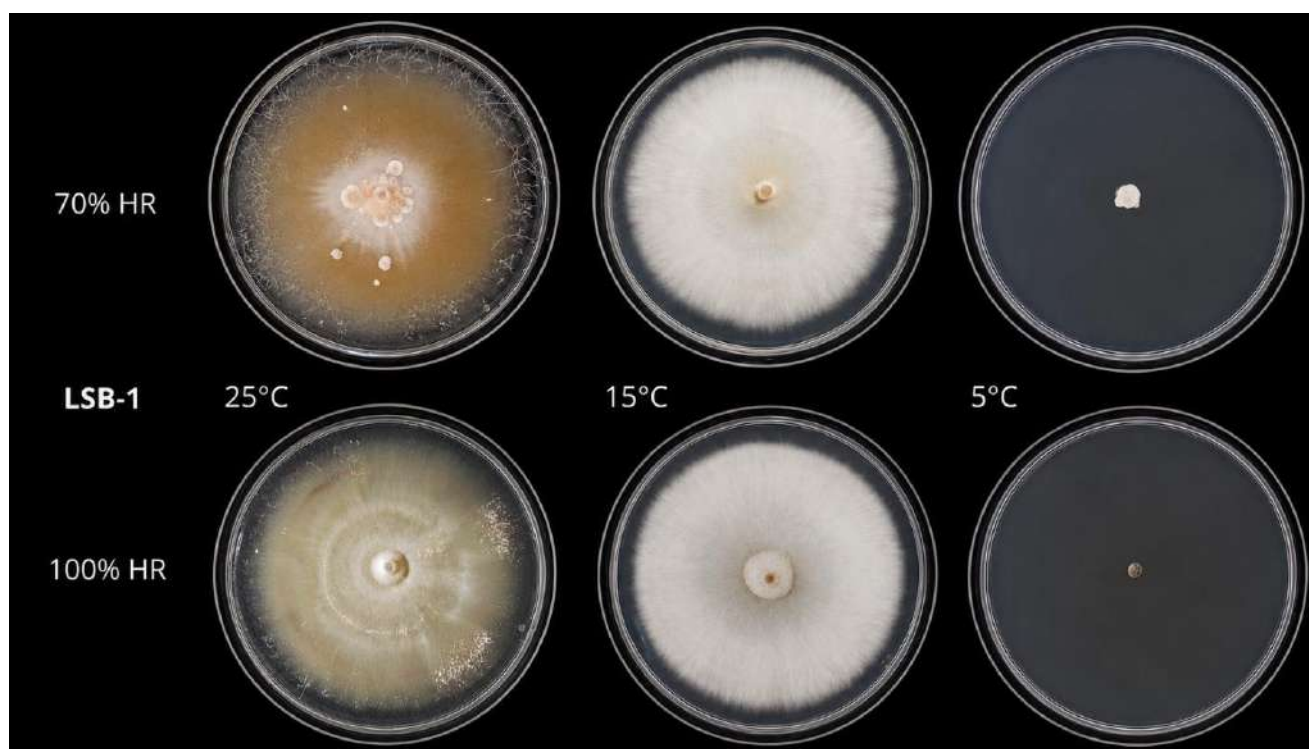
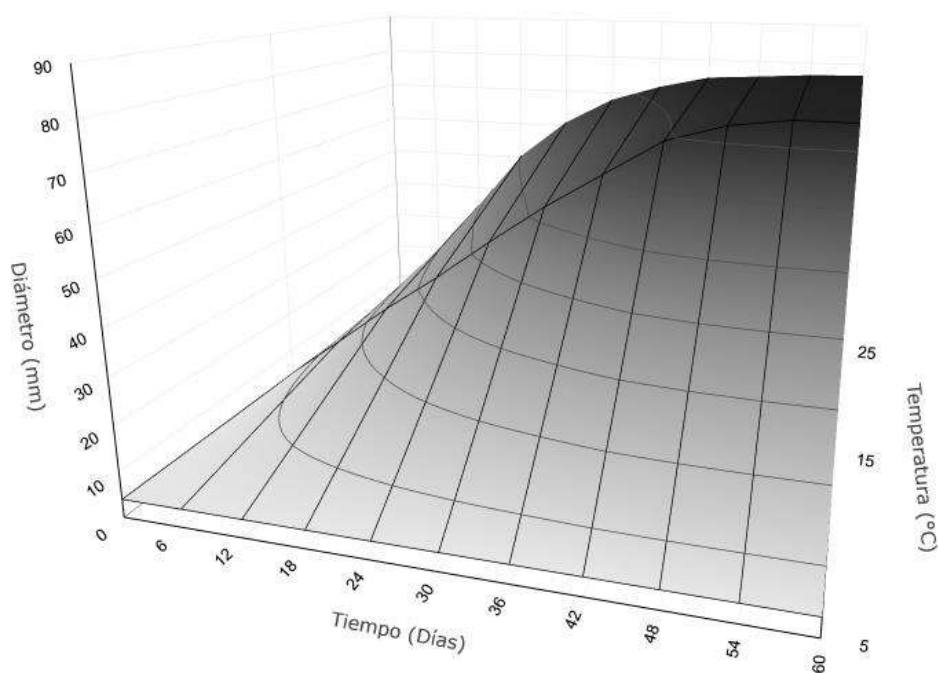


Figura 2. Anverso de colonias de la cepa LSB 1 de *H. citrifomis* al día 60 de incubación, cultivadas a 5°C, 15°C y 25°C, bajo condiciones de 70 ± 2% y 99-100% de humedad relativa, en oscuridad.

3. a)

Crecimiento de cepa LSB-1 (70% HR)



3. b)

Crecimiento de cepa LSB-1 (99% HR)

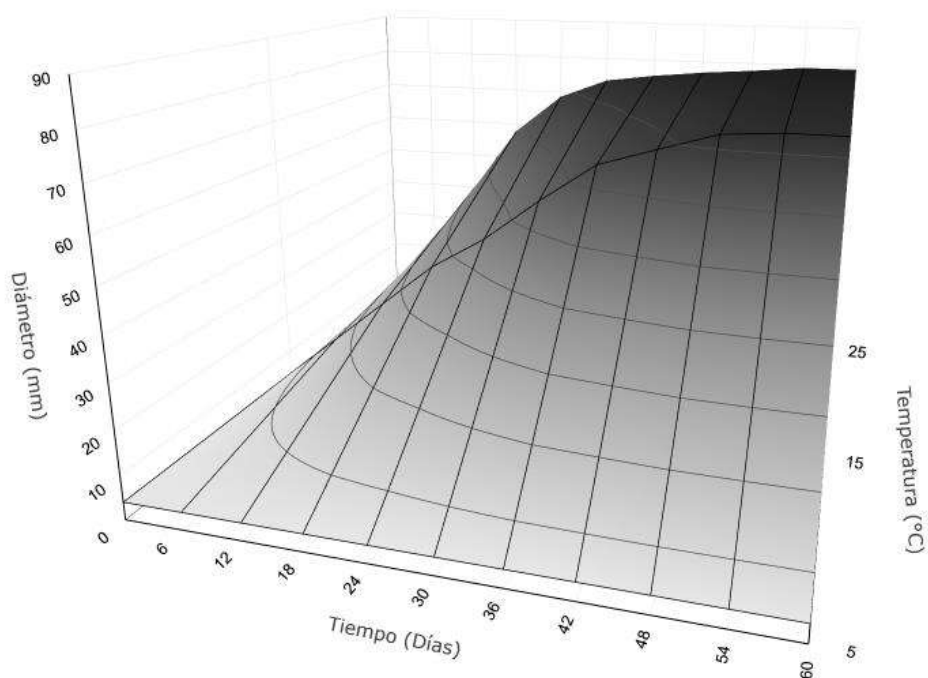


Figura 3. a) Crecimiento de la cepa LSB 1 en 25°C, 15°C y 5°C bajo la condición de $70 \pm 2\%$ de HR y
3. b) Crecimiento de la cepa LSB 1 en 25°C, 15°C y 5°C bajo la condición de 99-100% de HR.

En la cepa LSB 1, bajo la condición $70 \pm 2\%$ HR, el diámetro promedio aumentó progresivamente durante el periodo de evaluación, alcanzando 77 ± 2 mm a 25°C y 75 ± 5 mm a 15°C . En contraste, a 5°C no se observó crecimiento radial adicional, manteniéndose el diámetro cercano a 4 mm durante todo el ensayo. Bajo humedad saturada, LSB 1 también presentó su mayor crecimiento a 25°C , con un diámetro final de 79 ± 1 mm, mientras que a 15°C alcanzó 74 ± 5 mm. A 5°C , nuevamente, no se registró crecimiento radial adicional (figuras 2 y 3).

La cepa LSB 21 mostró un comportamiento similar, con mayor crecimiento a 25°C en ambas condiciones de humedad. Bajo la condición cercana a $70 \pm 2\%$ HR, alcanzó 78 ± 1 mm a 25°C y 66 ± 9 mm a 15°C , mientras que a 5°C el diámetro permaneció cercano al valor inicial. Bajo humedad saturada, la cepa LSB 21 alcanzó 76 ± 2 mm a 25°C y 58 ± 11 mm a 15°C , sin evidenciar crecimiento radial adicional a 5°C (figuras 4 y 5).

Al comparar ambas cepas, se observó que LSB 1 y LSB 21 presentaron comportamientos similares a 25°C y 5°C , tanto bajo la condición cercana a $70 \pm 2\%$ HR como bajo humedad saturada. Sin embargo, a 15°C , LSB 1 mostró un mayor crecimiento radial que LSB 21 en ambas humedades. Por otro lado, hubo un desarrollo de estructuras reproductivas visibles a 25°C en ambas humedades. Esta diferencia sugiere una posible variación fisiológica entre cepas chilenas de la misma especie.

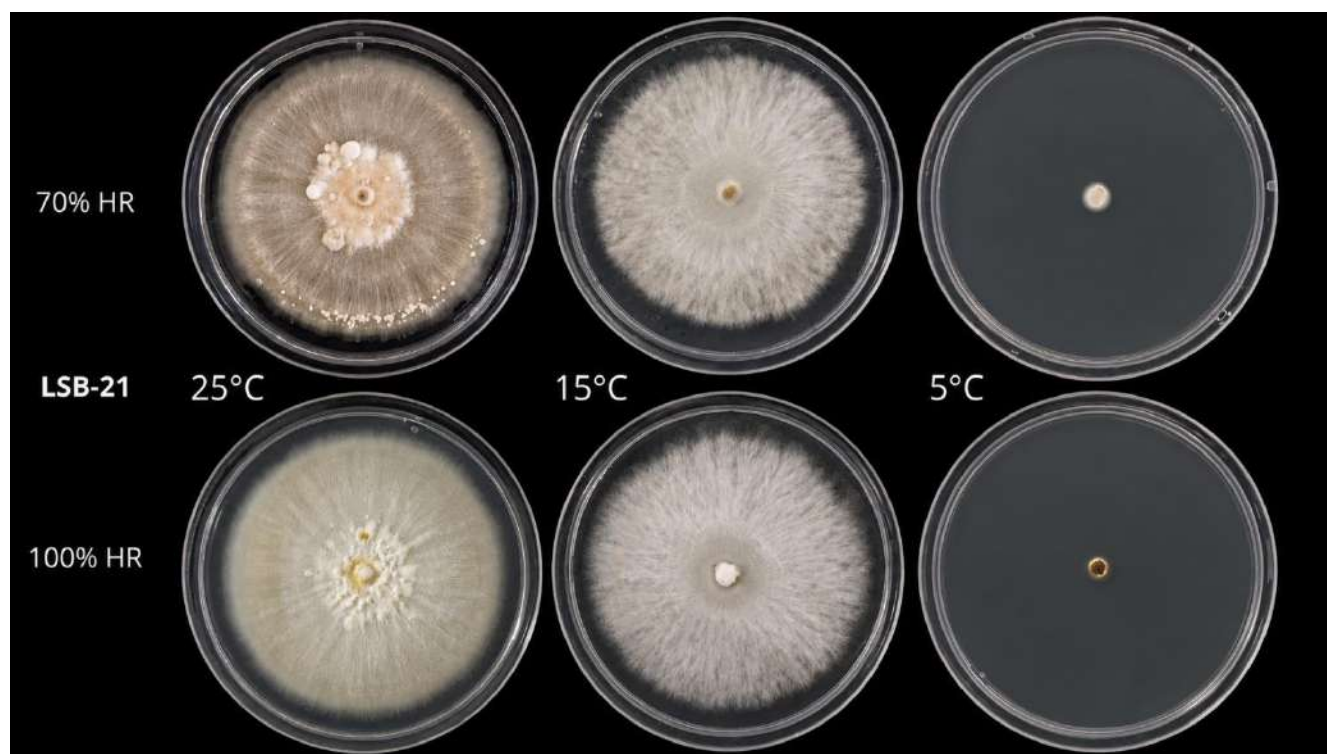
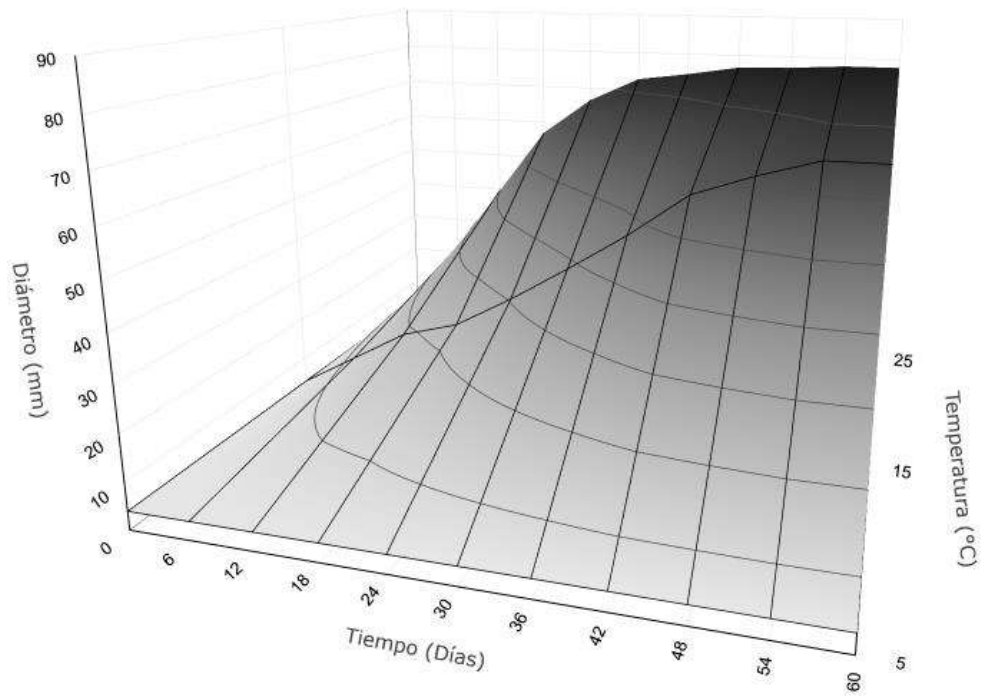


Figura 4. Anverso de colonias de la cepa LSB 21 de *H. citriformis* al día 60 de incubación, cultivadas a 5, 15 y 25°C , bajo condiciones de $70 \pm 2\%$ y 99-100% de humedad relativa, en oscuridad.

5. a)

Crecimiento de cepa LSB-21 (70% HR)



5. b)

Crecimiento de cepa LSB-21 (99% HR)

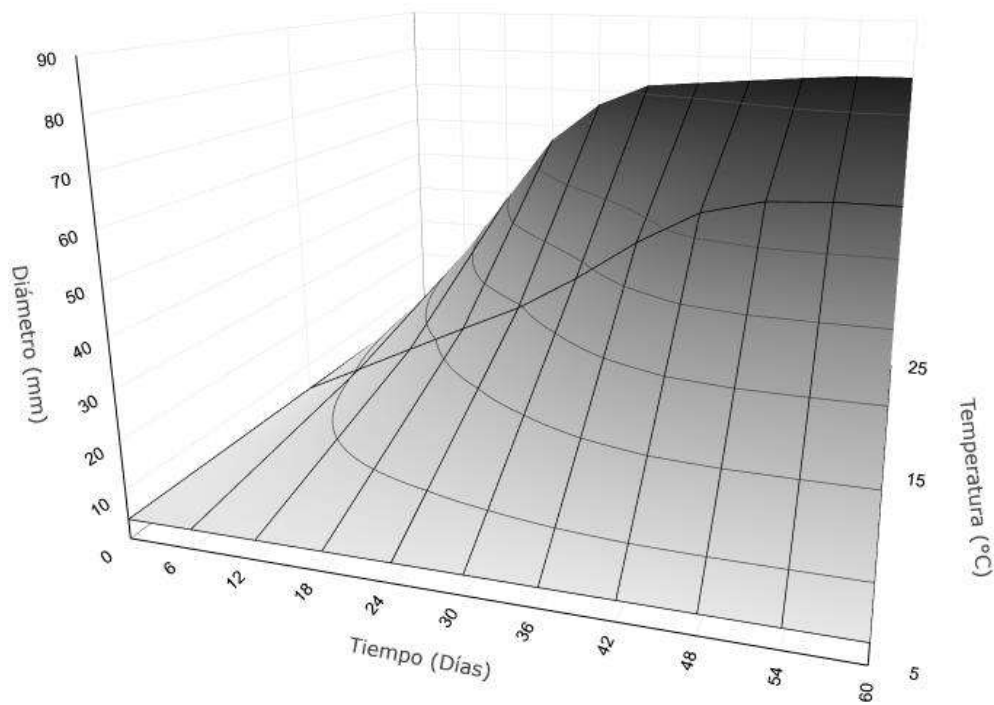


Figura 5. a) Crecimiento de la cepa LSB 21 en 25°C, 15°C y 5°C, bajo la condición de $70 \pm 2\%$ de HR y **5. b)** Crecimiento de la cepa LSB 21 en 25°C, 15°C y 5°C, bajo la condición 99-100% de HR.

Desde el punto de vista macroscópico, las colonias cultivadas a 25°C presentaron mayor desarrollo micelial y cubrieron gran parte de la superficie de la placa. En ambas cepas, el anverso mostró tonalidades claras, predominantemente blancas a blanco-crema, con variaciones hacia castaño muy pálido, marrón pálido o tonos levemente amarillentos. LSB 21 presentó colonias de crecimiento aplanado, filamentoso y de textura aterciopelada, con una zona central más marcada. Por su parte, LSB 1 presentó colonias aplanadas, de textura aterciopelada a ligeramente algodonosa, con sectores blanco-crema y tonalidades castaño pálido.

A 15°C, las colonias de ambas cepas mantuvieron una coloración predominantemente blanca a blanco-crema, aunque con menor desarrollo radial que a 25°C. El micelio presentó una apariencia más uniforme y compacta, especialmente bajo humedad saturada. A 5°C, las colonias permanecieron reducidas y cercanas al tamaño inicial del disco de micelio, sin evidencia clara de expansión radial sobre el medio PDA.

El análisis estadístico confirmó que el crecimiento micelial al día 60 estuvo determinado principalmente por la temperatura de incubación y por la cepa evaluada (Anexo 4). La prueba de Shapiro-Wilk indicó que los datos no presentaron una distribución normal ($p < 0,05$), lo que se relaciona con la marcada separación entre tratamientos, especialmente por la ausencia de crecimiento radial a 5°C y los altos diámetros observados a 25°C. Debido a ello, los resultados del ANOVA fueron interpretados considerando esta limitación y complementados con la observación descriptiva de los promedios por tratamiento.

El ANOVA factorial mostró que la temperatura tuvo un efecto altamente significativo sobre el crecimiento micelial al día 60 ($F = 366,550$, $p < 2e-16$), confirmando que fue el principal factor asociado al desarrollo radial de las colonias. La cepa también presentó un efecto significativo sobre el crecimiento ($F = 22,240$, $p = 2,35e-05$), lo que indica diferencias generales entre LSB 1 y LSB 21 bajo las condiciones evaluadas. La interacción cepa $\times$ temperatura fue significativa ($F = 8,852$, $p = 0,000573$), indicando que la diferencia de crecimiento entre ambas cepas dependió de la temperatura de incubación. Esta diferencia fue más evidente a 15°C, donde LSB 1 presentó mayor crecimiento radial que LSB 21, respaldando la existencia de variación fisiológica entre ambos aislamientos chilenos de *H. citriformis*.

La prueba post hoc de Tukey HSD para el factor cepa mostró que LSB 21 presentó un crecimiento promedio significativamente menor que LSB 1 (diff = -6,403704, p ajustado = 2,35e-05). Sin embargo, debido a que la interacción cepa $\times$ temperatura también fue significativa, esta comparación debe interpretarse considerando que la magnitud de la diferencia entre ambas cepas varió según la temperatura de incubación, siendo más marcada a 15°C.

3.2 Efecto de la humedad relativa

Al comparar las condiciones de humedad relativa, se observó que la humedad saturada no incrementó el crecimiento radial de forma general en ambas cepas. En LSB 1, los diámetros finales fueron levemente mayores bajo humedad saturada a 25°C, mientras que a 15°C, si bien se observó un crecimiento más rápido durante las primeras semanas bajo esta condición, los diámetros finales se mantuvieron cercanos a los registrados bajo $70 \pm 2\%$ HR. En contraste, LSB 21 presentó mayores diámetros bajo $70 \pm 2\%$ HR tanto a 25°C como a 15°C. A 5°C, la humedad relativa no modificó el crecimiento, ya que en ambas condiciones las colonias permanecieron cercanas al diámetro inicial.

El ANOVA factorial mostró que la humedad relativa no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento radial al día 60 ($F = 1,717$, $p = 0,196673$), por lo que las diferencias observadas entre $70 \pm 2\%$ HR y humedad saturada no fueron estadísticamente significativas. Asimismo, la interacción cepa $\times$ humedad tampoco fue significativa, aunque presentó una tendencia cercana al nivel de significancia ($F = 3,813$, $p = 0,057104$), lo que sugiere posibles diferencias descriptivas en la respuesta de cada cepa frente a la humedad relativa. Por su parte, la interacción humedad $\times$ temperatura no fue significativa ($F = 1,503$, $p = 0,233323$), al igual que la interacción triple cepa $\times$ humedad $\times$ temperatura ($F = 0,264$, $p = 0,769087$).

De este modo, si bien se observaron variaciones entre tratamientos, especialmente a 15°C y 25°C, estas no permitieron establecer un efecto estadístico significativo de la humedad relativa sobre el crecimiento radial de las cepas evaluadas.

3.3 Formación de sinemas y concentración final de conidias

Durante el periodo de incubación se observó formación de sinemas principalmente en la cepa LSB 1 incubada a 25°C (Anexo 5). Estas estructuras no fueron evidentes al inicio del periodo de evaluación, pero comenzaron a registrarse desde el día 46 en ambas condiciones de humedad relativa. En la condición $70 \pm 2\%$ HR, la cepa LSB 1 presentó una mayor formación de sinemas que bajo humedad saturada. A $70 \pm 2\%$ HR, tres placas presentaron sinemas desde el día 46, aumentando progresivamente hasta alcanzar presencia en seis placas al día 60 (cuadro 1). En esta última fecha se registró un total de 257 sinemas, con un promedio de $42,8 \pm 31,5$ sinemas por placa. Bajo 99-100% HR, una placa presentó sinemas desde el día 46 y la presencia de estas estructuras aumentó gradualmente hasta observarse en cinco placas al día 60 (cuadro 1). En esta condición se registró un total de 73 sinemas, con un promedio de $14,6 \pm 6,2$ sinemas por placa. La formación de sinemas fue, por lo tanto, más abundante bajo 70 %

HR que bajo 99-100% HR para esta cepa. Este resultado indica que la humedad saturada no incrementó la producción de sinemas en LSB 1 bajo las condiciones evaluadas. Por el contrario, la condición cercana a $70 \pm 2\%$ HR favoreció una mayor diferenciación de estas estructuras reproductivas a 25°C .

La concentración final de conidias también fue mayor en la cepa LSB 1 a 25°C bajo la condición $70 \pm 2\%$ HR. En este tratamiento, la concentración final estimada para placa completa fue de $3,88 \times 10^5$ conidias/mL (cuadro 1). Bajo humedad saturada, la concentración final fue menor, alcanzando $9,4 \times 10^4$ conidias/mL (cuadro 1). En la cepa LSB 21 no se registró la formación de sinemas cuantificables en las condiciones evaluadas, sin embargo, se obtuvieron conteos bajos de conidias desde micelio a 25°C , con una concentración final de 1×10^3 conidias/mL bajo $70 \pm 2\%$ HR y 5×10^3 conidias/mL bajo 99-100% HR (cuadro 1).

Cuadro 1. Resumen de cuantificación de sinemas y conidias al día 60. Los valores de sinemas y conidias están expresados en promedio $\pm$ EE.

			N placas	N placas con sinemas	Sinemas	Conidias desde sinemas	Conidias desde micelio	Concentración final (conidias /mL) *
70 ± 2% HR	25°C	LSB 1	7	6	42,8 ± 12,9	28,0 ± 10,2	10,8 ± 4,7	3,88 x 10 ⁵
		LSB 21	7	0			0,1 ± 0,1	1 x 10 ³
	15°C	LSB 1	5	0			0,0 ± 0,0	0
		LSB 21	5	0			0,0 ± 0,0	0
99-100% HR	25°C	LSB 1	7	5	14,6 ± 2,8	7,8 ± 3,0	1,6 ± 0,8	9.4 x 10 ⁴
		LSB 21	7	0			0,5 ± 0,5	5 x 10 ³
	15°C	LSB 1	5	0			0,0 ± 0,0	0
		LSB 21	5	0			0,0 ± 0,0	0

Nota (*): La concentración final corresponde a la placa completa.

A 15°C , no se registró el desarrollo de sinemas ni la producción de conidias en ninguna de las cepas, independientemente de la humedad relativa. En conjunto, estos resultados indican que la formación de sinemas y la producción de conidias estuvieron asociadas principalmente a la temperatura de 25°C y fueron más evidentes en LSB 1. Aunque ambas cepas presentaron crecimiento micelial bajo

las condiciones evaluadas, solo LSB 1 desarrolló sinemas cuantificables y mayores concentraciones finales de conidias, evidenciando diferencias fisiológicas entre ambos aislamientos.

4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que la temperatura fue el principal factor asociado al crecimiento micelial de *H. citriformis*. El patrón de crecimiento de ambas cepas en las tres temperaturas concuerda con antecedentes para *H. citriformis*, donde se ha descrito que su desarrollo ocurre de manera favorable en torno a temperaturas cercanas a 25-28 °C, rango que también se asocia con condiciones ambientales propicias para la ocurrencia de epizootias en terreno (Meyer *et al.* 2007, Hall *et al.* 2012, Pérez-González 2015, Pérez-González *et al.* 2022). Esto sugiere que, pese a que las cepas evaluadas provienen de regiones templadas y lluviosas del sur de Chile, sus requerimientos térmicos básicos se mantienen alineados con los descritos para aislamientos estudiados en latitudes tropicales y subtropicales.

La ausencia de crecimiento radial a 5°C evidencia una fuerte sensibilidad de la especie a bajas temperaturas. Este resultado coincide con observaciones realizadas en otras especies del género, como *H. uncinata*, que presentó únicamente 1 mm de crecimiento durante un periodo de cuatro semanas a 5°C (Seifert y Boulay 2004). Asimismo, el resultado es coherente con la condición mesófila descrita para muchos hongos entomopatógenos, cuyo crecimiento suele concentrarse en rangos moderados de temperatura y disminuye considerablemente bajo condiciones frías (Paixão *et al.* 2019). En términos aplicados, esto indica que la producción *in vitro* de *H. citriformis* requiere un control estricto de la temperatura, ya que temperaturas inferiores al rango favorable comprometen la generación de biomasa y, por ende, podrían limitar la eficiencia de un eventual escalamiento productivo.

Este resultado es relevante considerando el origen geográfico de los aislamientos. Las zonas del sur de Chile presentan temperaturas bajas durante una parte importante del año, por lo que la presencia natural del hongo en estos ambientes no necesariamente implica crecimiento micelial activo durante todo el periodo. Es posible que el hongo persista en microambientes protegidos, sobre el hospedero o como estructuras de baja actividad metabólica, activándose cuando la temperatura se aproxima a su rango fisiológico favorable.

Además del efecto de la temperatura, el análisis estadístico evidenció diferencias significativas entre cepas. La interacción cepa × temperatura muestra que LSB 1 y LSB 21 no respondieron de manera equivalente a los niveles térmicos evaluados, siendo la diferencia más evidente a 15°C. Este resultado es relevante porque demuestra que la identidad taxonómica no es suficiente para inferir el desempeño fisiológico de un aislamiento. En *Hirsutella* y otros hongos entomopatógenos, la variabilidad

intraespecífica puede expresarse en crecimiento, conidiación, tolerancia ambiental y patogenicidad, por lo que cada cepa debe ser evaluada individualmente antes de proyectar su uso aplicado (Tigano *et al.* 2006, Pérez-González *et al.* 2015, Qu *et al.* 2018).

La humedad relativa, en cambio, no presentó un efecto estadísticamente significativo sobre el crecimiento radial al día 60. Si bien descriptivamente se observaron diferencias entre tratamientos, estas no fueron suficientes para establecer una influencia general sobre la expansión micelial en PDA. Este resultado debe interpretarse con cautela, ya que el crecimiento radial en placa no representa necesariamente todos los procesos fisiológicos asociados al ciclo de vida del hongo. En condiciones naturales, la humedad relativa puede incidir de manera más directa en la germinación de conidias, adhesión, infección, persistencia de estructuras reproductivas y desarrollo de epizootias naturales, procesos que generalmente requieren valores superiores al 80 % HR (Hajek 1997, Pérez-González 2015, Pérez-González *et al.* 2022). En concordancia con ello, Hall *et al.* (2012) observaron en campo que las variables asociadas a humedad relativa se relacionaron con la presencia de adultos momificados por *H. citriformis*, aunque también señalaron que la dinámica del hongo puede verse afectada por la lluvia, las prácticas de manejo y la densidad del hospedero.

A diferencia de lo esperado, la condición de humedad saturada no favoreció una mayor producción de sinemas ni los conteos más altos de conidias. Aunque estas estructuras también estuvieron presentes bajo 99–100% HR, su abundancia fue considerablemente menor que en el tratamiento de $70 \pm 2\%$ HR. En este estudio, los sinemas se registraron principalmente en la cepa LSB 1 incubada a 25°C, a partir de aproximadamente el día 46, lo que indica que la saturación hídrica no promovió la diferenciación reproductiva bajo las condiciones evaluadas. Este resultado contrasta parcialmente con lo descrito para hongos entomopatógenos sobre el hospedero, donde una alta humedad relativa favorece la germinación, el desarrollo del micelio y la esporulación (Hajek 1997; Vega *et al.* 2012). Sin embargo, estos antecedentes corresponden principalmente al desarrollo del hongo durante el proceso de infección sobre el insecto hospedero y no necesariamente a cultivos *in vitro*. En las condiciones de este estudio, es posible que el ambiente cerrado utilizado para generar una humedad relativa de 99–100% haya modificado el microambiente de incubación, alterando el intercambio gaseoso y reduciendo la aireación efectiva. La literatura sobre producción de conidias en hongos entomopatógenos reconoce la aireación como un factor determinante para la diferenciación reproductiva y la calidad del inóculo (Muñiz-Paredes *et al.* 2017). Asimismo, se ha demostrado experimentalmente que una menor disponibilidad de oxígeno y una mayor acumulación de CO₂ pueden reducir la producción de conidias cuando la ventilación es limitada (Muñiz-Paredes *et al.* 2019). En consecuencia, es posible que la menor aireación, junto con otros cambios

asociados al microambiente de incubación, como la condensación sobre la superficie del cultivo, hayan limitado la diferenciación de sinemas y la producción de conidias observadas bajo humedad saturada.

La formación de sinemas es relevante porque corresponde a una característica morfológica importante dentro de *Hirsutella*, está directamente relacionada con la producción y dispersión de conidias. Estudios previos han descrito que *H. citriformis* produce sinemas tanto sobre insectos infectados como en cultivos *in vitro*, y que estas estructuras pueden actuar como puntos de origen para nuevas infecciones (Meyer *et al.* 2007, Casique-Valdés *et al.* 2011, Hall *et al.* 2012, Pérez-González *et al.* 2022). En este contexto, la presencia de sinemas en LSB 1 sugiere que esta cepa conserva capacidad de diferenciación reproductiva bajo condiciones controladas, lo cual resulta relevante para futuras evaluaciones de producción de inóculo.

Aunque ambas cepas crecieron bajo condiciones similares, solo LSB 1 desarrolló sinemas cuantificables y presentó mayores concentraciones finales de conidias. Esta variabilidad concuerda con lo reportado para *H. citriformis*, donde se ha observado que aislamientos provenientes de distintos hospederos, localidades o condiciones ambientales pueden diferir en crecimiento, esporulación y virulencia (Casique-Valdés *et al.* 2011, Pérez-González *et al.* 2015, Pérez-González *et al.* 2022). Por ello, los resultados de este estudio refuerzan la necesidad de seleccionar cepas no solo por su identidad taxonómica, sino también por su desempeño fisiológico y reproductivo.

La baja producción de conidias observada en este estudio coincide con una de las principales limitaciones descritas para *H. citriformis*. Diversos autores han señalado que esta especie presenta crecimiento lento, germinación lenta y escasa producción de conidias en comparación con otros hongos entomopatógenos, lo que dificulta su producción masiva y formulación como bioinsecticida (Raymundo-Jiménez *et al.* 2019, Cruz-Juárez *et al.* 2019, Pérez-González *et al.* 2022). En este estudio, la mayor concentración final se obtuvo en LSB 1 a 25°C bajo la condición cercana a $70 \pm 2\%$ HR, mientras que LSB 21 presentó valores muy bajos o ausencia de producción detectable. Esto indica que, aunque las cepas chilenas pueden crecer adecuadamente bajo ciertas condiciones, la producción de conidias continúa siendo un aspecto crítico para su aprovechamiento aplicado.

Los resultados también permiten relacionar el desempeño de las cepas chilenas con antecedentes de producción de *H. citriformis* en medios y sustratos alternativos. Raymundo-Jiménez *et al.* (2019) reportaron que la producción de conidias puede mejorar mediante el uso de medios enriquecidos con fuentes proteicas, particularmente quínoa, y que el extracto de levadura favorece la germinación.

De forma similar, estudios orientados a producción y formulación han mostrado que la calidad del sustrato, la fuente nutricional, el tipo de formulación y las condiciones de almacenamiento pueden modificar la viabilidad y vida útil de las conidias (Méndez-González *et al.* 2022, Flores-Villarreal *et al.*

2023, Cantú-Bernal *et al.* 2023). En comparación con esos estudios, el presente trabajo se centró en PDA y en el efecto de variables ambientales, por lo que futuras investigaciones podrían evaluar si las cepas LSB 1 y LSB 21 aumentan su producción conidial al ser cultivadas en medios enriquecidos, sustratos sólidos o sistemas bifásicos de fermentación.

Desde una perspectiva taxonómica y morfológica, la variación observada entre ambas cepas también es coherente con la complejidad descrita para el género *Hirsutella*. Hodge (1998) señaló que el género presenta una amplia variabilidad morfológica y que la identificación puede ser difícil debido a la diversidad de formas, presencia o ausencia de sinemas y variación en estructuras conidiogénicas. Esta consideración es relevante para interpretar los resultados de este estudio, ya que la ausencia de sinemas en LSB 21 bajo las condiciones evaluadas no necesariamente implica ausencia definitiva de capacidad reproductiva, sino que podría estar relacionada con requerimientos particulares de esa cepa o con las condiciones de cultivo utilizadas.

En términos aplicados, los resultados obtenidos aportan información básica sobre la ecofisiología de cepas chilenas de *H. citriformis*. La temperatura de 25°C favoreció tanto el crecimiento radial como la formación de estructuras reproductivas en LSB 1, mientras que 5°C limitó completamente el desarrollo radial. La humedad relativa no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento, pero sí se observaron diferencias descriptivas en la formación de sinemas y en la concentración final de conidias, especialmente en LSB 1. Estos resultados sugieren que la optimización de protocolos de cultivo para estas cepas debería considerar no solo la expansión micelial, sino también la diferenciación reproductiva, la concentración de conidias y su viabilidad como criterios independientes.

Una limitación de este estudio es que la formación de sinemas y la concentración de conidias fueron evaluadas de manera principalmente descriptiva, debido a que la producción de estructuras reproductivas no ocurrió en todos los tratamientos ni en ambas cepas. Además, el análisis de crecimiento consideró el diámetro final al día 60, por lo que futuras evaluaciones podrían incorporar modelos de crecimiento en el tiempo, tasas de crecimiento, viabilidad y germinación de conidias, además de ensayos de patogenicidad sobre hospederos potenciales. Estos antecedentes permitirían determinar si las condiciones que favorecen el crecimiento radial coinciden o no con aquellas que maximizan la producción de inóculo viable.

5. CONCLUSIÓN

Este estudio indica que la temperatura fue el factor más determinante en el crecimiento micelial de las cepas chilenas LSB 1 y LSB 21 de *H. citriformis*. El mayor crecimiento radial se registró a 25°C, seguido por un crecimiento intermedio a 15°C, mientras que a 5°C no se observó desarrollo micelial adicional al disco inicial. La humedad relativa no influyó significativamente el crecimiento radial al día 60, sin embargo, de manera descriptiva se observaron diferencias asociadas a la formación de estructuras reproductivas. En particular, la condición cercana al 70 % HR favoreció una mayor formación de sinemas y una mayor concentración final de conidias en la cepa LSB 1. Estos resultados refuerzan la necesidad de interpretar el crecimiento radial y la esporulación como procesos distintos, ya que una cepa puede presentar adecuado desarrollo micelial sin necesariamente producir sinemas o conidias en abundancia. Finalmente, este trabajo constituye una base inicial para futuras investigaciones orientadas a optimizar las condiciones de cultivo de cepas chilenas de *H. citriformis*, mejorar la producción de conidias viables y evaluar su potencial como agentes de control biológico en sistemas agrícolas o forestales del sur de Chile. En una siguiente etapa, sería recomendable evaluar viabilidad, germinación, estabilidad de conidias y patogenicidad sobre hospederos de interés, integrando los resultados fisiológicos obtenidos en esta tesina.

6. REFERENCIAS

- Bamisile BS, KS Akutse, JA Siddiqui, Y Xu. 2021. Model application of entomopathogenic fungi as alternatives to chemical pesticides: Prospects, challenges, and insights for next-generation sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science* 12: 741804. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.741804>
- Cantú-Bernal SH, R Gomez-Flores, RA Flores-Villarreal, AA Orozco-Flores, CI Romo-Sáenz, R Montesinos-Matías, MA Mellín-Rosas, JA Sánchez-González, O Pérez-González, P Tamez-Guerra. 2023. Adult *Diaphorina citri* biocontrol using *Hirsutella citriformis* strains and gum formulations. *Plants* 12: 3184. <https://doi.org/10.3390/plants12183184>
- Casique-Valdés R, AY Reyes-Martínez, SR Sánchez-Peña, MJ Bidochka, JI López-Arroyo. 2011. Pathogenicity of *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Cordycipitaceae) to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Florida Entomologist* 94(3): 703-705. <https://doi.org/10.1653/024.094.0341>

- Cruz-Juárez G, MG Maldonado Blanco, MA Jackson. 2019. Nutritional impact on the biomass yield of *Hirsutella citriformis* and sporulation on inorganic substrates. *Biocontrol Science and Technology* 29(9): 827-839. <https://doi.org/10.1080/09583157.2019.1608508>
- Dirección Meteorológica de Chile. 2019. Reporte anual de la evolución del clima en Chile: Informe climático del año 2018. Dirección General de Aeronáutica Civil. Disponible en <https://archivocambioclimatico.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2021/06/ReporteClima%CC%81tico2018-edJulio2019.pdf>
- Flores-Villarreal RA, AA Orozco-Flores, SH Cantú-Bernal, R Gomez-Flores, O Pérez-González, P Tamez-Guerra. 2023. Increased *Hirsutella citriformis* conidia shelf life in Acacia and *Hirsutella* gum formulations. *Applied Sciences* 13(13): 7912.
- Gielen R, K Ude, A Kaasik, K Põldmaa, T Teder, T Tammaru. 2024. Entomopathogenic fungi as mortality agents in insect populations: A review. *Ecology and Evolution* 14: e70666. <https://doi.org/10.1002/ece3.70666>
- Hajek AE. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. In Jones J ed. *Advances in Microbial Ecology*. Volume 15. Plenum Press, p. 193-250.
- Hall DG, MG Hentz, JM Meyer, AB Kriss, TR Gottwald, DG Boucias. 2012. Observations on the entomopathogenic fungus *Hirsutella citriformis* attacking adult *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in a managed citrus grove. *BioControl* 57: 663-675. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9448-0>
- Hodge KT. 1998. Revisionary studies in *Hirsutella* (Anamorphic Hypocreales: Clavicipitaceae). Doctoral dissertation. Cornell University.
- Mains EB. 1951. Entomogenous species of *Hirsutella*, *Tilachlidium* and *Synnematium*. *Mycologia* 43: 691-718.
- Manríquez Avello JM. 2023. Caracterización morfológica y molecular de cepas de *Hirsutella* sp. aisladas en la región de Los Ríos y Los Lagos, Chile. Trabajo de Tesina. Universidad Austral de Chile.
- Méndez-González F, JM Castillo-Minjarez, O Loera, E Favela-Torres. 2022. Current developments in the resistance, quality, and production of entomopathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 38: 115. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03301-9>
- Meyer JM, MA Hoy, DG Boucias. 2007. Morphological and molecular characterization of a *Hirsutella* species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology* 95(2): 101-109. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.01.005>

- Minter DW, BL Brady. 1980. Mononematous species of *Hirsutella*. Transactions of the British Mycological Society 74: 271-282.
- Montalva C, E Rojas, E Valenzuela, RA Humber. 2017. *Hirsutella* sp. (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) affecting the invasive social wasp *Vespula vulgaris* (Hymenoptera: Vespidae) in southern Chile. Florida Entomologist 100(3): 663-666. <https://doi.org/10.1653/024.100.0327>
- Muñiz-Paredes F, Miranda-Hernández F, Loera O. 2017. Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. World J Microbiol Biotechnol. 33(3):57. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2229-2>.
- Muñiz-Paredes F, Sánchez-García L, Garza-López P, Viniegra-González G, Loera O. 2019. Improved conidiation from entomopathogenic fungi through 26% oxygen pulses in solid-state culture depends on a balance between headspace volume and substrate amounts. Lett Appl Microbiol. 69(4):279-285. <https://doi.org/10.1111/lam.13206>.
- Paixão FRS, ÉKK Fernandes, N Pedrini. 2019. Termotolerancia de las conidias fúngicas. In Khan MA, W Ahmad eds. Microbios para el manejo sostenible de plagas de insectos. Springer Nature Suiza AG. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23045-6_6
- Peel MC, BL Finlayson, TA McMahon. 2007. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. Hydrology and Earth System Sciences 11: 1633-1644. <https://doi.org/10.5194/hess-11-1633-2007>
- Pérez-González O. 2015. Aislamiento, producción y evaluación de la patogenicidad de cepas de *Hirsutella citriformis* Speare para el control de *Diaphorina citri* Kuwayama, vector de la enfermedad Huanglongbing de los cítricos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas.
- Pérez-González O, R Rodríguez-Guerra, JI López-Arroyo, CF Sandoval-Coronado, MG Maldonado-Blanco. 2015. Radial growth, sporulation, and virulence of Mexican isolates of *Hirsutella citriformis* against *Diaphorina citri*. Southwestern Entomologist 40(1): 111-120.
- Pérez-González O, R Gomez-Flores, P Tamez-Guerra. 2022. Insight into biological control potential of *Hirsutella citriformis* against Asian citrus psyllid as a vector of citrus Huanglongbing disease in America. Journal of Fungi 8: 573. <https://doi.org/10.3390/jof8060573>
- Posit team. 2025. RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC. Disponible en <https://posit.co/>
- Quandt CA, RM Kepler, W Gams, JPM Araújo, S Ban, HC Evans, D Hughes, R Humber, N Hywel-Jones, Z Li, JJ Luangsa-ard, SA Rehner, T Sanjuan, H Sato, B Shrestha, G-H Sung, Y-J Yao, R

- Zare, JW Spatafora. 2014. Phylogenetic-based nomenclatural proposals for Ophiocordycipitaceae (Hypocreales) with new combinations in Tolypocladium. IMA Fungus 5(1): 121-134. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2014.05.01.12>
- Quesada-Sojo KA, W Rivera-Méndez. 2016. Hirsutella, agente biocontrolador de ácaros e insectos de importancia agronómica. Tecnología en Marcha 29: 85-93.
- Qu J, X Zou, J Yu, Y Zhou. 2017. The conidial mucilage, natural film coatings, is involved in environmental adaptability and pathogenicity of Hirsutella satumaensis Aoki. Scientific Reports 7: 1301. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01368-1>
- Qu J, X Zou, Y Zhou, J Zhang, Y Han, X Zou. 2018. Estimated divergence times of Hirsutella (asexual morphs) in Ophiocordyceps provides insight into evolution of phialide structure. BMC Evolutionary Biology 18: 111. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1227-6>
- Qu J, X Zou, W Cao, Z Xu, Z Liang. 2021. Two new species of Hirsutella (Ophiocordycipitaceae, Sordariomycetes) that are parasitic on lepidopteran insects from China. MycoKeys 82: 81-96. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.82.66927>
- Raymundo-Jiménez R, E García-Ibarra, JI López-Arroyo, NYZ Ramírez-Cabral, R Rodríguez-Guerra. 2019. Producción y germinación de conidios del hongo entomopatógeno Hirsutella citriformis (Ascomycota: Ophiocordycipitaceae). Scientia Fungorum 49: e1221. <https://doi.org/10.33885/sf.2019.49.1221>
- Restrepo-García AM, O Pérez-González, A Soto-Giraldo. 2024. Primer aislamiento de Hirsutella citriformis en Colombia y evaluación de su patogenicidad. Boletín Científico Museo de Historia Natural 28(2): 181-190.
- Seifert KA, H Boulay. 2004. Hirsutella uncinata, a new hyphomycete from Australia. Mycologia 96(4): 929-934. Disponible en <http://www.jstor.org/stable/3762126>
- Simmons DR, RM Kepler, SA Rehner, E Groden. 2015. Phylogeny of Hirsutella species (Ophiocordycipitaceae) from the USA: Remedying the paucity of Hirsutella sequence data. IMA Fungus 6(2): 345-356. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.02.06>
- Speare AT. 1920. On certain entomogenous fungi. Mycologia 12: 62-76. Disponible en <https://scispace.com/pdf/on-certain-entomogenous-fungi-58ku6p74zw.pdf>
- Subandiyah S, N Nikoh, S Tsuyumu, S Somowiyarjo, T Fukatsu. 2000. Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid Diaphorina citri (Homoptera: Psylloidea). Zoological Science 17: 983-989.
- Sung GH, NL Hywel-Jones, JM Sung, JJ Luangsa-Ard, B Shrestha, JW Spatafora. 2007. Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi. Studies in Mycology 57: 5-59.

- Tigano MS, B Adams, S Maimala, D Boucias. 2006. Genetic diversity of *Hirsutella thompsonii* isolates from Thailand based on AFLP analysis and partial beta-tubulin gene sequences. *Genetics and Molecular Biology* 29(4): 715-721.
- Toledo AV, RA Humber, CC López Lastra. 2008. First and southernmost records of *Hirsutella* (Ascomycota: Hypocreales) and *Pandora* (Zygomycota: Entomophthorales) species infecting Dermaptera and Psocodea. *Journal of Invertebrate Pathology* 97(2): 193-196. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.09.001>
- Vega FE, NV Meyling, JJ Luangsa-ard, M Blackwell. 2012. Fungal Entomopathogens. In Vega FE, HK Kaya eds. *Insect Pathology*. 2nd ed. Academic Press, p. 172-220.
- Xie S-W, D-P Wei, J-Z Qiu, X-C Peng, J-C Kang, Z-J He, Z-Z Li, C-R Li, S-K Huang, X Zhang, Z-L Liu, J Bu, NN Wijayawardene, T-C Wen. 2025. Overview of *hirsutella*-like anamorphs in *Ophiocordyceps* (Sordariomycetes, Ophiocordycipitaceae): Introducing two new species and one new record from China. *MycKeys* 119: 95-121. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.119.145174>
- Zhang X, X-C Peng, D-P Wei, Y Wang, C Norphanphoun, S Hongsanan, N Xie, Z-L Liu, A Mapook, J-C Kang, N Saichana, KD Hyde, T-C Wen. 2026. Reappraisal of the phylogenetic relationships of *hirsutella*-like fungi across Ophiocordycipitaceae and Polycephalomycetaceae (Hypocreales, Sordariomycetes), and the description of seven new species. *IMA Fungus* 17: e171084. <https://doi.org/10.3897/imafungus.17.171084>

ANEXOS

Anexo 1. Origen geográfico y hospederos de las cepas de *Hirsutella citriformis*

Cepa	Hospedero	Localidad	Coordenadas	Fecha colecta
LSB 1	Díptera	Arboretum, Valdivia	18H 648798 5592927	01/10/2016
LSB 21	Coleóptera	La Poza, Puerto Montt	18G 690834 5366205	08/05/2017

Anexo 2. Estructuración ensayo

Cepa	5°C/70HR	15°C/70HR	25°C/70HR	5°C/100HR	15°C/100HR	25°C/100HR
LSB 1	7	7	7	7	7	7
LSB 21	7	7	7	7	7	7

Anexo 3. Diámetro promedio registrado por cepa por tratamiento cada 6 días de medición. Expresados en promedio $\pm$ EE (mm)

			0 días	6 días	12 días	18 días	24 días	30 días	36 días	42 días	48 días	54 días	60 días
70 $\pm$ 2% HR	25°C	LSB 1	4 $\pm$ 0	19 $\pm$ 1	35 $\pm$ 1	51 $\pm$ 2	61 $\pm$ 2	68 $\pm$ 2	73 $\pm$ 1	75 $\pm$ 1	76 $\pm$ 1	77 $\pm$ 1	77 $\pm$ 1
		LSB ₂₁	4 $\pm$ 0	22 $\pm$ 0	40 $\pm$ 0	57 $\pm$ 0	67 $\pm$ 0	73 $\pm$ 0	75 $\pm$ 0	77 $\pm$ 0	78 $\pm$ 0	78 $\pm$ 0	78 $\pm$ 0
	15°C	LSB 1	4 $\pm$ 0	14 $\pm$ 0	24 $\pm$ 1	34 $\pm$ 1	44 $\pm$ 1	53 $\pm$ 1	61 $\pm$ 1	70 $\pm$ 2	74 $\pm$ 2	75 $\pm$ 2	75 $\pm$ 2
		LSB ₂₁	4 $\pm$ 0	12 $\pm$ 1	19 $\pm$ 2	23 $\pm$ 3	31 $\pm$ 3	39 $\pm$ 8	48 $\pm$ 3	58 $\pm$ 4	62 $\pm$ 3	66 $\pm$ 4	66 $\pm$ 4
	5°C	LSB 1	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0
		LSB ₂₁	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0
	25°C	LSB 1	4 $\pm$ 0	22 $\pm$ 0	40 $\pm$ 0	58 $\pm$ 0	69 $\pm$ 0	74 $\pm$ 0	76 $\pm$ 0	77 $\pm$ 0	78 $\pm$ 0	80 $\pm$ 0	80 $\pm$ 0
		LSB ₂₁	4 $\pm$ 0	22 $\pm$ 0	39 $\pm$ 0	56 $\pm$ 0	66 $\pm$ 0	72 $\pm$ 1	73 $\pm$ 0	74 $\pm$ 0	75 $\pm$ 1	76 $\pm$ 1	76 $\pm$ 1
	15°C	LSB 1	4 $\pm$ 0	15 $\pm$ 0	26 $\pm$ 0	37 $\pm$ 1	45 $\pm$ 1	55 $\pm$ 1	65 $\pm$ 1	69 $\pm$ 1	73 $\pm$ 2	74 $\pm$ 2	74 $\pm$ 2
		LSB ₂₁	4 $\pm$ 0	11 $\pm$ 1	17 $\pm$ 2	24 $\pm$ 3	30 $\pm$ 4	38 $\pm$ 4	47 $\pm$ 4	54 $\pm$ 4	58 $\pm$ 4	58 $\pm$ 5	58 $\pm$ 5
99- 100% HR	5°C	LSB 1	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0
		LSB ₂₁	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0

Anexo 4. Pruebas estadísticas para el análisis de crecimiento al día 60

Prueba de Normalidad

Prueba	Estadístico	valor-P
Estadístico W Shapiro- Wilk	0,91392	< 0,000000000000000022

ANOVA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Cepa	1	583	583	22.240	2.35e-05 ***
Humedad	1	45	45	1.717	0.196673
Temperatura	2	19209	9604	366.550	< 2e-16 ***
Cepa: H	1	100	100	3.813	0.057104
Cepa: T	2	464	232	8.852	0.000573 ***
H: T	2	10079	39	1.503	0.233323
C: H: T	2	14	7	0.264	0.769087
Residuals	45	1179	26		

Tukey HSD

CEPA	diff	lwr	upr	p adj	
LSB 21-LSB 1		-6.403704	-9.138622	-3.668785	2.35e-05
HR	diff	lwr	upr	p adj	
99-70		-1.89532	-5.393555	1.602915	0.2818433
T (°C)	diff	lwr	upr	p adj	
15-5		64.649898	56.049126	73.25067	0
25-5		73.966667	65.515858	82.41748	0
25-15		9.316768	4.916665	13.71687	1.432298e-05
HR: T	diff	lwr	upr	p adj	
99:5 - 70:5		-1.243450e-14	-19.4725379	19.472538	1
99:15 - 70:15		-5.106061e+00	-13.2343566	3.022235	0.4380034
99:25 - 70:25		3.333333e-01	-6.7770322	7.443699	0.9999923
C: H: T	diff	lwr	upr	p adj	
LSB 21.68.5-LSB 1.68.5		-1.790568e-12	-32.9516535	32.9516535	1.0000000
LSB 21.99.5-LSB 1.99.5		-3.126388e-13	-32.9516535	32.9516535	1.0000000
LSB 21.68.15-LSB 1.68.15		-9.151515e+00	-23.2605702	4.9575399	0.6028136
LSB 21.99.15-LSB 1.99.15		-1.263636e+01	-26.0888198	0.8160926	0.0890219
LSB 21.68.25-LSB 1.68.25		4.124875e+00	-7.8410736	16.0908239	0.9932130
LSB 21.99.25-LSB 1.99.25		-2.136364e+00	-14.1954340	9.9227067	0.9999882

Anexo 5. Registro cepa LSB 1 al día 60 con formación de (a) sinemas, (b) fiálides y (c) conidias.

