



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

Evaluación de *Isaria fumosorosea* y
Metarhizium anisopliae para el control
biológico de *Meccus pallidipennis* en
condiciones de laboratorio

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. ANY LAURA FLORES VILLEGAS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: M. en C. MARGARITA CABRERA BRAVO

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dra. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA
Dr. GUILLERMO SALGADO MALDONADO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

Evaluación de *Isaria fumosorosea* y
Metarhizium anisopliae para el control
biológico de *Meccus pallidipennis* en
condiciones de laboratorio

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. ANY LAURA FLORES VILLEGAS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: M. en C. MARGARITA CABRERA BRAVO

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dra. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA
Dr. GUILLERMO SALGADO MALDONADO

MÉXICO, D.F.

2011

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 08 de agosto de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **FLORES VILLEGAS ANY LAURA** con número de cuenta **98041422** con la tesis titulada: **"EVALUACIÓN DE ISARIA FUMOSOROSEA Y METARHIZIUM ANISOPLIAE PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE MECCUS PALLIDIPENNIS EN CONDICIONES DE LABORATORIO."** realizada bajo la dirección de: **M EN C. MARGARITA CABRERA BRAVO**

Presidente: DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA
Vocal: DR. MIGUEL ARMANDO ULLOA SOSA
Secretario: DRA. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR
Suplente: DR. GUILLERMO SALGADO MALDONADO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de septiembre de 2011



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

Al programa de becas CONACYT, por el apoyo recibido con número de CVU/Becario:
326511/233644

A la Dra. Margarita Cabrera Bravo por sus atinadas correcciones sobre la enfermedad de Chagas

A la Dra. Concepción Toriello Nájera por sus revisiones sobre hongos entomopatógenos

Al Dr. Guillermo Salgado Maldonado por sus comentarios sobre el manuscrito de tesis

Y a los miembros del jurado:

Dr. Miguel Ulloa Sosa

Dra. Margarita Villegas Ríos

Dra. María del Carmen auxilio González Villaseñor

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Por el material del insectario:

A la Dra. Paz María Salazar Schettino, Gloria Rojas Wastavino, Dra. Martha Bucio y Mauro Vences Blanco

Por los cortes histológicos y ayuda con la microscopía electrónica de transmisión:

Al Dr. Armando Pérez, Irma López

A el laboratorio de Micología básica:

Hortencia Navarro Barranco

Miguel Ángel Ayala Zermeño

Por sus revisiones en los bioensayos:

Dr. Víctor Hernández Velázquez

Por la ayuda con las fotos de triatóminos:

Susana Guzmán Gómez

DEDICATORIA

A mi madre:

Luz María Villegas Díaz.

A mi Familia:

David Flores Villegas, Paola Flores Villegas y Brenda Flores Villegas e Iraiz Zamudio Escobar.

A todos mis compañeros y amigos:

Adela Ruiz, Yolanda Guevara, Nelia Luna, Tania Paredes, Israel López, Elia Torres, Mariana De Alba, Carolina Brunner, Evita Anaya.

ÍNDICE

	PÁGS.
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. ENFERMEDAD DE CHAGAS	16
1.2. TRANSMISORES	16
1.3. ALTERNATIVAS DE CONTROL PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	16
1.4. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	16
1.5. INOCUIDAD EN VERTEBRADOS E INVERTEBRADOS NO BLANCO	17
2. ANTECEDENTES	19
2.1. CONTROL BIOLÓGICO EN PLAGAS AGRÍCOLAS	19
2.2. CONTROL BIOLÓGICO EN TRANSMISORES DE ENFS. PARASITARIAS	23
3. JUSTIFICACIÓN	30
4. HIPÓTESIS	31
5. OBJETIVOS	32
5.1. OBJETIVO GENERAL	32
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	32
6. METODOLOGÍA	33
6.1. REPRODUCCIÓN DEL CICLO BIOLÓGICO DE <i>M. pallidipennis</i>	33
6.2. AISLADOS FÚNGICOS (HONGOS ENTOMOPATÓGENOS)	34
6.3. BIOENSAYOS DE VIRULENCIA: CL ₅₀ Y TL ₅₀	36
6.3.1. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL ₅₀)	36
6.3.2. TIEMPO LETAL MEDIO (TL ₅₀)	39
6.4. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISIÓN (MET)	41
7. RESULTADOS	42
7.1. REPRODUCCIÓN DEL CICLO BIOLÓGICO DE <i>M. pallidipennis</i>	42
7.2. AISLADOS FÚNGICOS (HONGOS ENTOMOPATÓGENOS)	44
7.3. BIOENSAYOS DE VIRULENCIA: CL ₅₀ Y TL ₅₀	46
7.3.1. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL ₅₀)	46
7.3.2. TIEMPO LETAL MEDIO (TL ₅₀)	50
7.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)	66
8. DISCUSIÓN	70
9. CONCLUSIONES	80
10. BIBLIOGRAFÍA	82
11. ANEXOS	93

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGS.
Figura 1. Enfermedad de Chagas. (A) Tripomastigotes metacíclicos (flecha), (B) tripomastigote sanguíneo (flecha), (C) signo de Romaña en niño de Oaxaca (flecha). Cortesía de Dra. Paz María Salazar-Schettino, Lab. de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina, UNAM.	1
Figura 2. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> . (a) Durante la ingesta de sangre, el insecto defeca en la piel. (b) Los tripomastigotes metacíclicos son expulsados con las heces y penetran por lesiones en piel o mucosa. (c) Los tripomastigotes dentro de las células se transforman en amastigotes. (d) Cuando ocurre la disrupción celular, los tripomastigotes son liberados (e) infectando nuevas células, (f) integrándose al torrente sanguíneo o (g) colonizando músculo y tejido neural como nidos de amastigotes. (h) Los triatominos se infectan cuando se alimentan de sangre con tripomastigotes sanguíneos. (i) En el intestino medio del vector, los tripomastigotes sanguíneos se transforman en epimastigotes y estas formas se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, completando así el ciclo de vida (Modificado de Macedo et al., 2002).	2
Figura 3. Distribución actual de <i>Meccus pallidipennis</i> en la República Mexicana.	6
Figura 4. Hembra y macho de <i>Meccus pallidipennis</i> (Cortesía de Lab. Biología de Parásitos).	7
Figura 5. Representación esquemática de los aspectos macroscópicos en huevos de dos especies de triatominos: (A) <i>Triatoma infestans</i> . (B) <i>Triatoma delponi</i> (Modificado de Carcavallo et al., 1999b).	8
Figura 6. Esquema general del mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos (modificado de Charnley y St. Leger, 1991).	12
Figura 7. <i>Isaria fumosorosea</i> . (A) Aspecto macroscópico de la colonia (Cortesía de la Dra. Conchita Toriello, Lab. de Micología básica, Facultad de Medicina, UNAM). (B) Morfología del conidióforo (Domsch et al., 1980; Barron, 1983). (C) Conidios (Domsch et al., 1980).	13
Figura 8. <i>Metarhizium anisopliae</i> . (A) Aspecto macroscópico de la colonia (Cortesía de la Dra. Conchita Toriello). (B) Morfología del conidióforo (Barron, 1983). (C) Columnas de conidios, conidios y fiálides (Watanabe, 1994).	15
Figura 9. Control biológico en langostas. El programa LUBILOSA en África (A) desarrolló el bioplaguicida "Green Muscle"® (B) contra <i>Oedaleus senegalensis</i> (Orthoptera: Acrididae) (C) a partir de una formulación de <i>Metarhizium acridum</i> (D) (www.lubilosa.org).	20
Figura 10. Casos de control biológico en México. (A) Mosca pinta o salivazo de los pastos (Hemiptera: Cercopidae). (B) Infectada con <i>M. anisopliae</i> . (C) <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Hemiptera: Aleyrodidae). (D)	

Infectada con <i>Isaria fumosorosea</i> . Cortesía de la Dra. Conchita Toriello, Lab. de Micología básica, Facultad de Medicina, UNAM.	22
Figura 11. Desinfección de los huevos de <i>M. pallidipennis</i> .	37
Figura 12. Bioensayo de virulencia. (A) Infección del huevo. (B) Transferencia a cajas con agar-agua (1%).	38
Figura 13. Ciclo de desarrollo de <i>Meccus pallidipennis</i> . (A) Huevo viable. (B) Coloración blanquecina de huevos de dos semanas de haber sido ovipuestos, coloración marrón o naranja de huevos a puntos de eclosionar. (C) Ninfa uno (3 mm), vista dorsal. (D) Ninfa dos (7 mm). (E) Ninfa tres (11 mm). (F) Ninfa cuatro (15 mm). (G) Ninfa cinco (23 mm) y primordios alares (flecha). (H) Adulto hembra 32-35mm, aparato ovipositor (flecha). (I) Adulto macho 31-34 mm.	43
Figura 14. Colonias y microscopía de los aislados fúngicos en medio de APD. (A) <i>Isaria fumosorosea</i> cepa EH-511/3. (B) Conidióforos y conidios de <i>I. fumosorosea</i> con azul de algodón, 400 X. (C) <i>Metarhizium anisopliae</i> cepa EH-473/4. (D) Conidios catenulados de <i>M. anisopliae</i> con azul de algodón, 400 X.	45
Figura 15. Porcentaje de eclosión en 36 huevos testigos de <i>M. pallidipennis</i> .	47
Figura 16. Mortalidad acumulada para calcular la CL ₅₀ del hongo <i>I. fumosorosea</i> en huevos de <i>M. pallidipennis</i> .	48
Figura 17. Mortalidad acumulada del estadio de huevo de <i>Meccus pallidipennis</i> infectados con conidios de <i>I. fumosorosea</i> .	51
Figura 18. Porcentaje de eclosión en 25 huevos testigos de <i>M. pallidipennis</i>	52
Figura 19. Huevos infectados con conidios de <i>I. fumosorosea</i> (EH-511/3). Se observan hifas emergiendo del opérculo (48 h) hasta cubrir totalmente el huevo a las 240 h. La estrella indica el tiempo en el cual se realizó la microscopía electrónica de transmisión.	53
Figura 20. Signos de la micosis en huevos de <i>M. pallidipennis</i> infectados con <i>I. fumosorosea</i> . Corion transparente a los cinco (A) y diez días posterior a la infección (B).	54
Figura 21. Características de <i>I. fumosorosea</i> (EH-511/3) aislado de los huevos infectados. Colonia en medio de APD (A) y conidióforos y conidios típicos del hongo, 400 X (B).	55
Figura 22. Porcentaje de esporulación en 66 huevos de <i>M. pallidipennis</i> infectados con conidios de <i>I. fumosorosea</i> .	55
Figura 23. Huevos de 10 días posteriores a la infección. (A-D) Esporulación de <i>Isaria fumosorosea</i> , se observa micelio saliendo del opérculo (flecha). (E) Huevo sin esporular, se observan únicamente hifas somáticas (flecha).	56

- Figura 24.** Mortalidad acumulada del estadio de huevo de *Meccus pallidipennis* infectados con conidios de *M. anisopliae* 59
- Figura 25.** Porcentaje de eclosión en 25 huevos testigos de *M. pallidipennis* infectados con *M. anisopliae*. 60
- Figura 26.** Huevos de una a tres semanas de haber sido ovipuestos, infectados con conidios de *M. anisopliae* (EH-473/4). Se observan hifas emergiendo del opérculo (60 h) hasta cubrir totalmente el huevo a las 240 h. La estrella indica el tiempo en el cual se realizó la microscopía electrónica de transmisión. 61
- Figura 27.** Signos de la micosis en huevos de *M. pallidipennis* infectados con *M. anisopliae*. Corion café a los seis (B y C) y diez días posteriores a la infección (D). 62
- Figura 28.** Características de *M. anisopliae* (EH-473/4) aislado de los huevos infectados. Colonia en medio de APD (A) y conidios cilíndricos típicos del hongo, 400 X (B). 62
- Figura 29.** Porcentaje de esporulación en 66 huevos de *M. pallidipennis* infectados con conidios de *M. anisopliae*. 63
- Figura 30.** Huevos de 10 días posteriores a la infección. (A-D) Esporulación de *Metarhizium anisopliae*, se observan agregados de conidios en columna típicos de la especie (C-D) (flecha). (E) Huevo sin esporular, se observan únicamente hifas somáticas (flecha). 63
- Figura 31.** Corte semifino transversal de huevo testigo de *M. pallidipennis* de 15 días. Se observa el exocorión del huevo (EX), el espacio vitelino (EV), endocorio (END) y el embrión (EMB), 1250X. 66
- Figura 32.** Microscopía electrónica de transmisión en huevos de *Meccus pallidipennis* a las 144 h (6 días) de haber sido infectados con *Isaria fumosorosea* (EH-511/3). (A) Citoplasma del testigo totalmente uniforme, las células conservan su forma y núcleo. (B) Conidio (flecha) cerca de células del embrión con destrucción del citoplasma. (C) Cuerpos hifales rodeados de material mucilaginoso (flecha). (D) Conidios de *I. fumosorosea* rodeados de material mucilaginoso (flecha). (E) Conidios del hongo en el espacio vitelino del huevo. (F) Segmento de cuerpo hifal rodeado de material mucilaginoso. 67
- Figura 33.** Corte semifino transversal de huevo de *M. pallidipennis* de 15 días sin infección. Se observa el exocorio del huevo (EX), el espacio vitelino (EV), endocorio (END) y el embrión (EMB), 1250X. 68
- Figura 34.** Microscopía electrónica de transmisión en huevos de *Meccus pallidipennis* a las 156 h de haber sido infectados con *Metarhizium anisopliae* (EH-473/4). (A) Citoplasma del testigo totalmente uniforme. (B y C) Conidio con sus estructuras internas y la doble pared celular rodeado de tejido mucilaginoso. (D) Conidios del hongo y vacuolización. (E) Cuerpo hifal con septo. (F) Estructuras fúngicas dentro y fuera de la membrana vitelina. 69

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGS.
Tabla 1. Clasificación actual de la subfamilia Triatominae y principales géneros reportados en México	4
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Meccus pallidipennis</i> (Stål, 1872)	5
Tabla 3. Principales características de los hongos entomopatógenos <i>I. fumosorosea</i> y <i>M. anisopliae</i>	16
Tabla 4. Origen de las cepas de <i>I. fumosorosea</i> y <i>M. anisopliae</i>	35
Tabla 5. Ciclo de desarrollo de huevo a adulto en <i>Meccus pallidipennis</i> con condiciones de temperatura y humedad controlada en laboratorio, alimentados cada tercer día en ratones CD-1	42
Tabla 6. Promedio de huevos ovipuestos por hembras de <i>Meccus pallidipennis</i>	44
Tabla 7. Concentración de conidios y ejemplares utilizados para la obtención de la CL ₅₀ en el estadio de huevos de <i>Meccus pallidipennis</i>	46
Tabla 8. Porcentaje de mortalidad acumulada obtenida con cinco diferentes concentraciones de conidios en huevos de <i>Meccus pallidipennis</i>	47
Tabla 9. CL ₅₀ del hongo entomopatógeno <i>Isaria fumosorosea</i>	49
Tabla 10. Mortalidad acumulada en 75 huevos de <i>M. pallidipennis</i> infectados con <i>Isaria fumosorosea</i> (EH-511/3)	50
Tabla 11. Valores del TL ₅₀ para <i>I. fumosorosea</i> en huevos de <i>Meccus pallidipennis</i>	51
Tabla 12. Conidios de <i>I. fumosorosea</i> en huevos esporulados de <i>M. pallidipennis</i>	57
Tabla 13. Mortalidad acumulada en 75 huevos de <i>M. pallidipennis</i> infectados con <i>Metarhizium anisopliae</i> (EH-473/4)	58
Tabla 14. Valores del TL ₅₀ para <i>M. anisopliae</i> en huevos de <i>Meccus pallidipennis</i>	59
Tabla 15. Conidios de <i>M. anisopliae</i> en huevos esporulados de <i>M. pallidipennis</i>	64

RESUMEN

Un componente clave en el control integral de los transmisores de la enfermedad de Chagas es el uso de insecticidas químicos. Sin embargo, se han presentado problemas de resistencia, contaminación ambiental y riesgos para la salud humana, además de que los transmisores peridomésticos (*Meccus pallidipennis*) son más difíciles de controlar. Los hongos entomopatógenos *Isaria fumosorosea* (EH-511/3) y *Metarhizium anisopliae* (EH-473/4) son capaces de controlar a diversos insectos que son plagas agrícolas. El objetivo de este estudio fue observar el efecto de dos especies de hongos entomopatógenos, *I. fumosorosea* y *M. anisopliae*, en huevos de *M. pallidipennis*, evaluando en condiciones de laboratorio, el porcentaje de mortalidad, el tiempo letal medio (TL₅₀), la capacidad de reproducción de los hongos, el porcentaje de esporulación, cantidad de conidios por huevo infectado y microscopía electrónica de transmisión (MET). Se determinaron los tiempos de desarrollo en *M. pallidipennis* para asegurar los especímenes a utilizar en los bioensayos. Para la concentración letal media (CL₅₀) se probaron cinco diferentes concentraciones de *I. fumosorosea*: 1×10^7 , 3×10^6 , 1×10^6 , 3×10^5 y 1×10^5 conidios/mL, empleando 36 huevos viables por cada concentración de conidios. Para el tiempo letal medio (TL₅₀) se utilizaron 75 huevos viables de *M. pallidipennis*, infectados con 2 µL de una suspensión de 3×10^5 conidios/mL (600 conidios) de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae*. Se incubaron a 28°C con fotoperíodo de 12 x 12 h (luz-oscuridad). Se observaron durante 10 días y se registró la mortalidad cada 12 h. Para comprobar los cambios patológicos en los huevos infectados se realizó MET. Se reprodujo el ciclo de desarrollo de *M. pallidipennis* bajo condiciones de laboratorio en 193.8 días. La CL₅₀ de *I. fumosorosea* en huevos de *M. pallidipennis* fue de 2.263×10^2 o de 226.349 conidios por huevo. La cepa EH-511/3 de *I. fumosorosea* presentó una mortalidad acumulada del 92% y un TL₅₀ de 66.685 h o 2.77 días y la cepa EH-473/4 de *M. anisopliae* presentó una mortalidad acumulada del 88% y un TL₅₀ de 76.320 h o 3.18 días, sin diferencias estadísticas significativas entre las dos especies de entomopatógenos en relación a la mortalidad acumulada a los tres (F= 8.0; t = 1.162; g.l.= 4; P = 0.310), seis y nueve días (F = 0.800; t = 0.775; g.l.= 4; P = 0.482). El aislado que produjo mayor cantidad de conidios por huevo infectado fue EH-511/3 de *I. fumosorosea* (F= 2.785; t = 2.934; g.l.= 22; P = 0.008). En MET Se observaron cuerpos hifales, hifas con septos y blastoconidios en el embrión en ambos hongos entomopatógenos. Los resultados de este estudio apoyan el desarrollo de nuevas estrategias en el control de los transmisores de la enfermedad de Chagas, particularmente a nivel del peridomicilio, donde las actuales acciones (uso de insecticidas químicos) han fracasado.

ABSTRACT

A key component in the integrated control of Chagas disease vectors is the use of chemical insecticides. However, the utility of insecticides is being undermined by problems of insecticide resistance, environmental contamination and risks to human health, and also the peridomestic populations of triatomines (*Meccus pallidipennis*) are more difficult to control. The entomopathogenic fungi *Isaria fumosorosea* (EH-511/3) and *Metarhizium anisopliae* (EH-473/4) are able to control many insects that are agricultural pests. The aim of this research was to determine the virulence of two entomopathogenic fungi *I. fumosorosea* and *M. anisopliae* in the eggs of *M. pallidipennis*, evaluating by bioassays in laboratory conditions, the cumulative mortality, mean lethal time (LT₅₀), mean concentration dose (LD₅₀), percentage of sporulation, conidia production per egg and perform transmission electron microscopy (TEM) to confirm fungal egg penetration. The life cycle of *M. pallidipennis* was developed to ensure the specimens used in the bioassays. The LD₅₀ bioassay of *I. fumosorosea* was performed with 1×10^7 , 3×10^6 , 1×10^6 , 3×10^5 and 1×10^5 conidia/mL, using 36 eggs per conidial concentration. The LT₅₀ bioassay of *I. fumosorosea* and *M. anisopliae* was performed with 75 eggs from *M. pallidipennis*, and infected with 2 µl of a 3×10^5 conidia/mL suspension (600 conidia/egg). All infected eggs were incubated at 28°C and 12 h/12h photophase (light-dark). Mortality was monitored every 12 h. To check the pathological changes of infected insects, transmission electron microscopy (TEM) was performed. The development cycle of *M. pallidipennis* under laboratory conditions was 193.8 days. The values of LD₅₀ in *I. fumosorosea* was 2.263×10^2 or 226.349 conidia per egg. *I. fumosorosea* EH-511/3 showed a cumulative mortality of 92% and TL₅₀ of 66.685 h or 2.77 days and *M. anisopliae* EH-473/4 showed a cumulative mortality of 88% and TL₅₀ of 76.320 h or 3.18 days. No statistical difference between both fungal species used was observed in the cumulative mortality at three (F= 8.0; t = 1.162; g.l.= 4; P= 0.310), six and nine days (F= 0.800; t = 0.775; g.l.= 4; P= 0.482). The isolate that produced the highest conidia production per infected egg was *I. fumosorosea* EH-511/3 (F= 2.785; t = 2.934; g.l.= 22; P= 0.008). Hyphal bodies, hyphae with septa and blastoconidia of both entomopathogenic fungi were observed in the destroyed embryo by MET. The results of this study support the development of new strategies to control Chagas disease vectors by microbial agents, particularly addressed to the peridomiciliary level, where current tactics (use of chemical insecticides) are reported to fail.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas es actualmente la enfermedad parasitaria más importante de Latinoamérica, representa un problema de salud pública para la mayor parte de países en esta región, con un estimado actual de 10 millones de personas infectadas y 40 millones en riesgo (Schofield et al., 2006). El agente etiológico de esta enfermedad es *Trypanosoma cruzi*, el cual se encuentra en las heces de triatóminos (transmisor), la infección se adquiere por la introducción del parásito a través de la piel. Estos insectos infestan viviendas o áreas cercanas y tienen diversos hábitats donde se esconden, desde techos de palma hasta grietas en las paredes. Esta parasitosis fue descrita por primera vez en 1909, por el investigador brasileño Carlos Ribeiro Justiniano Das Chagas (Dias et al., 2002). Las zonas de riesgo para la transmisión de la enfermedad se ubican generalmente en áreas rurales donde existe una alta proporción de viviendas en condiciones precarias y una convivencia estrecha con el ambiente silvestre del transmisor (Salazar-Schettino et al., 2005).

La enfermedad está restringida a Latinoamérica y se extiende desde el sur de Estados Unidos de América hasta el norte de Chile y Argentina (WHO-World Health Organization, 2002). El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* involucra la transmisión por insectos hematófagos de la familia Reduviidae de los que en México existen ocho géneros con 32 especies distribuidas a lo largo del territorio nacional. Estos transmisores llevan las formas infectantes de *T. cruzi* (tripomastigotes metacíclicos) en su materia fecal, la cual es depositada en la piel durante o después de la alimentación (Fig. 1 A).

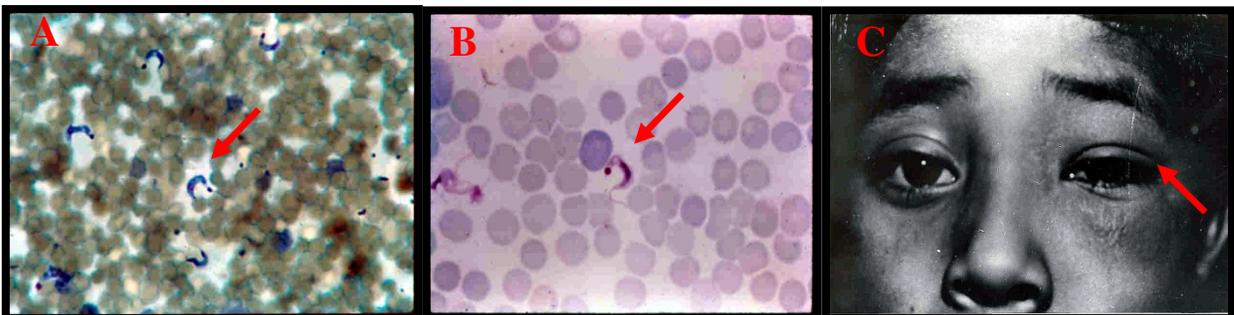


Figura 1. Enfermedad de Chagas. (A) Tripomastigotes metacíclicos (flecha), (B) tripomastigote sanguíneo (flecha), (C) signo de Romaña en niño de Oaxaca (flecha). Cortesía de Dra. Paz María Salazar-Schettino, Lab. de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina, UNAM.

Trypanosoma cruzi pertenece al reino Protista, familia Trypanosomatidae, dentro del orden Kinetoplastida; son organismos flagelados que poseen un cinetoplasto (estructura constituida por una red fibrosa de ADN localizada en la mitocondria de la célula (Levine et al., 1980).

El parásito penetra al hospedero por lesiones en piel o mucosa y puede invadir gran variedad de células, donde se transforma para dar lugar al amastigote (fase replicativa intracelular). Estas formas intracelulares dan lugar al tripomastigote que se encuentra frecuentemente en sangre (Fig. 1 B), medio por el cual se disemina a otras células y tejidos. Durante esta fase sanguínea puede ser ingerido por el transmisor. Dentro del insecto transmisor, se transforman en epimastigotes y posteriormente en tripomastigotes metacíclicos, infectantes para los mamíferos (Kollien et al., 2000) (Fig. 2).

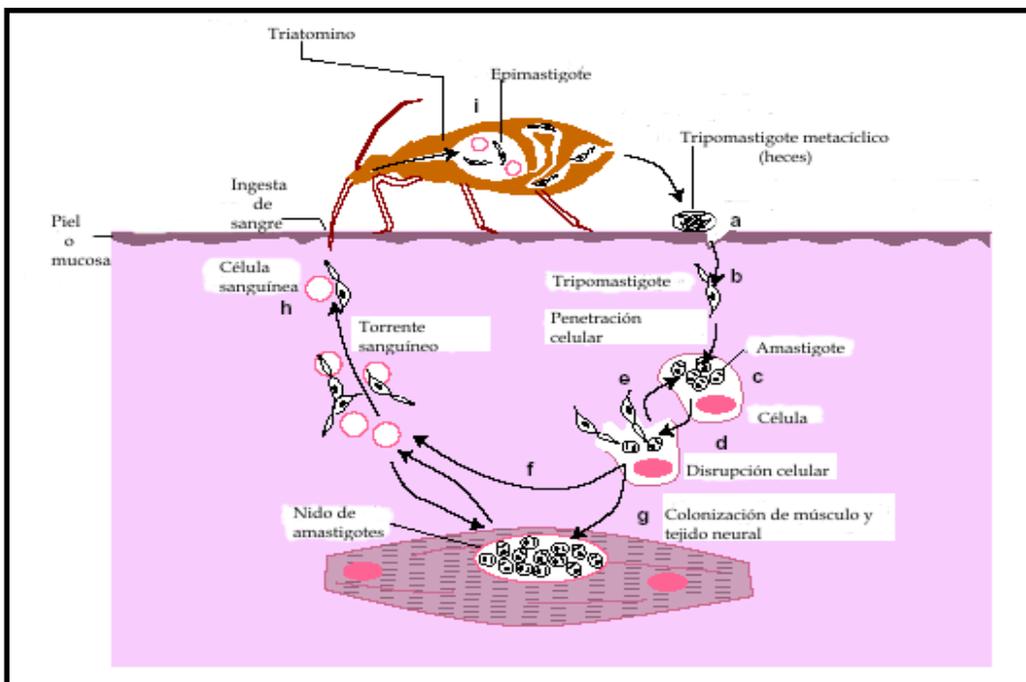


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. **(a)** Durante la ingesta de sangre, el triatómino defeca en la piel. **(b)** Los tripomastigotes metacíclicos son expulsados con las heces y penetran por lesiones en piel o mucosa. **(c)** Los tripomastigotes dentro de las células se transforman en amastigotes. **(d)** Cuando ocurre la ruptura celular, los tripomastigotes son liberados **(e)** infectando nuevas células, **(f)** integrándose al torrente sanguíneo o **(g)** colonizando músculo y tejido neural como nidos de amastigotes. **(h)** Los triatóminos se infectan cuando se alimentan de sangre con tripomastigotes sanguíneos. **(i)** En el intestino medio del vector, los tripomastigotes sanguíneos se transforman en epimastigotes y estas formas se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, completando así el ciclo de vida (Modificado de Macedo et al., 2002).

Existen diversos mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas; el mecanismo natural se presenta cuando un triatómino defeca sobre el hospedero, depositando tripomastigotes metacíclicos, que penetran por el sitio de la picadura, mucosas o heridas. Éste es el más importante, ya que es el mecanismo de infección en áreas rurales (Chagas rural). Otro mecanismo es por transfusión sanguínea (Chagas urbano), el segundo en importancia y por último, el connatal, que se presenta cuando una madre infectada puede transmitir este parásito vía transplacentaria al producto durante el parto y a través de la leche materna. Existen otros mecanismos menos frecuentes en la transmisión de *T. cruzi* al hombre, como son la ingestión de alimentos contaminados con materia fecal de triatóminos, accidentes de laboratorio, transplante de órganos y la manipulación e ingestión de animales infectados (Salazar-Schettino et al., 2002).

Cuando *Trypanosoma cruzi* penetra en el organismo, es seguido por un período de incubación de cuatro a catorce días, tiempo en el que se introduce a las células y se desencadenan diversos mecanismos propios de la relación parásito/hospedero. En la evolución del cuadro clínico de la enfermedad se presentan tres fases: aguda, donde el signo más connotado es el signo de Romaña (que se caracteriza por edema bpalpebral o unilateral e indoloro) (Fig. 1 C); indeterminada o crónica asintomática y crónica sintomática donde el corazón es el más comúnmente afectado (Salazar-Schettino et al., 2005).

El control de la enfermedad de Chagas, inició poco después de que Carlos Chagas describiera la enfermedad en la primera década del siglo pasado. Los principales trabajos se enfocan al control del transmisor utilizando insecticidas, mejoramiento de la vivienda, tamizaje en bancos de sangre y educación para la salud (Dias et al., 2002).

En México, como en la mayor parte de Latinoamérica, la posibilidad de transmisión de la enfermedad ocurre frecuentemente por medio del transmisor (más del 85%), comúnmente denominados chinches besuconas (Salazar-Schettino et al., 2005). Se estima que una población total de 71, 120, 043 en la República Mexicana que habita en zonas rurales está en riesgo constante para la transmisión de la enfermedad de Chagas, y otros 20, 328, 746 de individuos están en riesgo por su residencia ocasional en zonas infestadas (Ramsey et al., 2003a).

1.2. TRANSMISORES

La clasificación sistemática actual de la subfamilia Triatominae reconoce 19 géneros y 137 especies (Galvao et al., 2003) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación actual de la subfamilia Triatominae y principales géneros reportados en México

Subfamilia	Tribu	Género	No. de especies válidas
TRIATOMINAE	Alberproseniini (Martínez y Carcavallo, 1977)	<i>Alberprosenia</i>	2
		<i>*Belminus</i>	6
		<i>Bolbodera</i>	1
	Bolboderini (Usinger, 1944)	<i>Microtriatoma</i>	2
		<i>Parabelminus</i>	2
	Cavernicolini (Usinger, 1944)	<i>Cavernicola</i>	2
		<i>Torrealbaia</i>	1
	Linshcosteini (Carcavallo, Jurberg, Lent, Noireau y Galvao, 2000)	<i>Linshcosteus</i>	6
	Rhodniini (Pinto, 1926)	<i>Psammolestes</i>	3
		<i>*Rhodnius</i>	16
		<i>*Dipetalogaster</i>	1
		<i>*Eratyrus</i>	2
		<i>Hermanlenticia</i>	1
		<i>*Meccus</i>	6
	Triatomini (Jeannel, 1919)	<i>Mepraia</i>	2
		<i>Nesotriatoma</i>	3
		<i>*Panstrongylus</i>	13
		<i>*Paratriatoma</i>	1
		<i>*Triatoma</i>	67
Total	6	19	137

Tomado de Galvao et al., 2003

*Principales géneros reportados en México

En México, se han reportado ocho géneros y 32 transmisores de *Trypanosoma cruzi*, siendo el país latinoamericano con el mayor número de especies, de las cuales 19 corresponden al género *Triatoma*, seis a *Meccus*, dos a *Panstrongylus* y una especie para cada uno de los siguientes géneros: *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma* y *Rhodnius*. Dos géneros (*Dipetalogaster* y *Meccus*) y 15 especies son endémicas de México; el género *Triatoma* incluye ocho especies que sólo se encuentran en México (Galvao et al., 2003).

De acuerdo a su hábitat los triatóminos se dividen en especies silvestres y domésticas, con una categoría intermedia de peridomésticas, las cuales ocasionalmente penetran en las casas atraídas por la luz o por búsqueda de alimento (se alimentan del hombre ocasionalmente). Las especies peridomésticas son los transmisores más importantes de la enfermedad de Chagas en México (Bautista et al., 2001), también llamados “visitantes” (a un perímetro de 50 m alrededor de la casa y que completan algunos estadios de desarrollo de su ciclo de vida en el intradomicilio). Éstas son: *Meccus bassolsae*, *M. longipennis*, *M. mazzottii*, *M. phyllosomus*, *M. picturata*, *M. pallidipennis*, *Triatoma gerstaeckeri*, *T. mexicana*, *T. rubida* y *Dipetalogaster maxima* (las dos últimas en proceso de adaptación al domicilio). La ubicación taxonómica actual de *Meccus pallidipennis* (Stål, 1872) según Galvao et al. (2003) se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Meccus pallidipennis* (Stål, 1872)

<i>Meccus pallidipennis</i> (Stål, 1872)	
PHYLUM	Arthropoda
CLASE	Insecta
ORDEN	Hemiptera
SUBORDEN	Heteroptera
FAMILIA	Reduviidae
SUBFAMILIA	Triatominae
TRIBU	Triatomini (Jeannel, 1919)
GÉNERO	<i>Meccus</i> (Stål, 1859)
ESPECIE	<i>pallidipennis</i> (Stål, 1872)

Mazzotti, en 1936, reportó en Oaxaca a *Meccus pallidipennis*, como el primer triatómino infectado con *Trypanosoma cruzi* en México, el cual es uno de los más importantes en la dinámica de transmisión de la enfermedad de Chagas en nuestro país. La biología y el comportamiento de esta especie han sido ampliamente estudiados, debido a su contacto frecuente con el hombre como fuente de alimento y diversas tasas de infección con *Trypanosoma cruzi* (Enger et al., 2004; Bautista et al., 1999). Este transmisor ha sido reportado en 13 estados (Fig. 3): Colima, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz y Zacatecas (Carcavallo et al., 1997a; Salazar-Schettino et al., 2010). Se ha encontrado en altitudes de 200 a 1580 m sobre el nivel de mar.

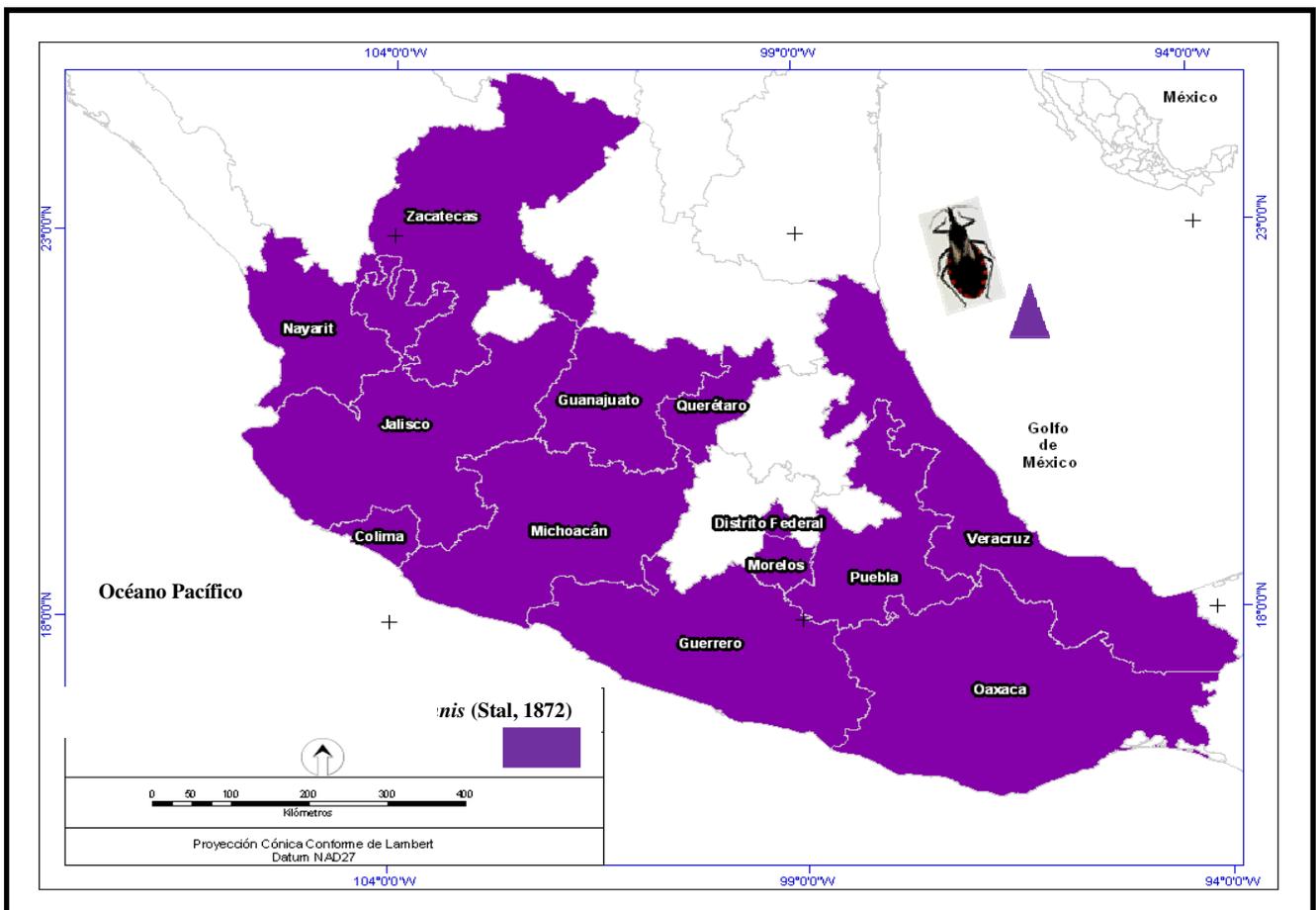


Figura 3. Distribución actual de *Meccus pallidipennis* en la República Mexicana.

Es una especie endémica de tamaño considerable, la hembra mide de 3.2-3.5 cm y el macho de 3.1-3.4 cm (Lent y Wygodzinsky, 1979); su cuerpo es ancho, sobre todo en la región abdominal (♂ 12-13mm y ♀ 13-16mm) (Fig. 4). Tienen un color que va del pardo oscuro al negro, con marcas características de color rojo-naranja en el conexivo; posee un par de alas de color blanco-amarillento relativamente angostas, que no cubren la totalidad del conexivo. Su cabeza y sus patas son de color negro. La cabeza es ligeramente más larga que el pronoto. La región anteocular es tres veces más larga que las posocular. Los tubérculos anteníferos son muy cortos (Lent y Wygodzinsky, 1979).

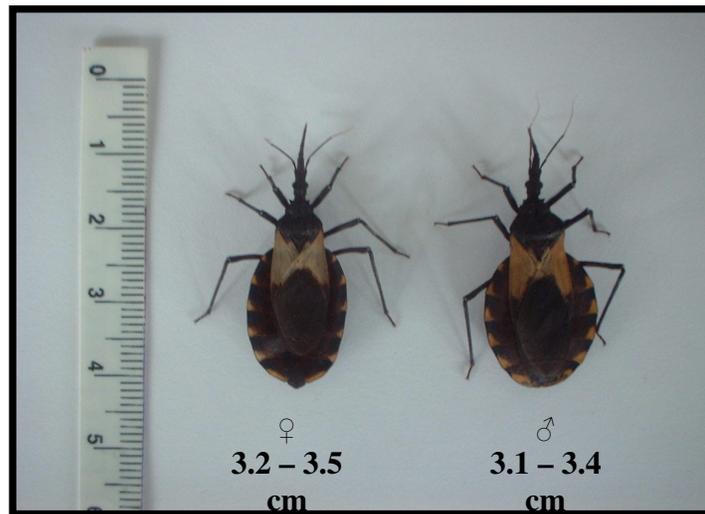
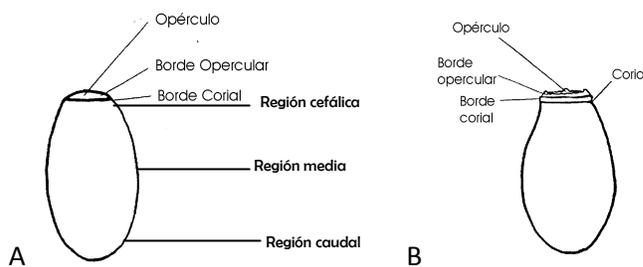


Figura 4. Hembra y macho de *Meccus pallidipennis* (Cortesía de Lab. Biología de Parásitos).

Sus fuentes de alimento como hematófagos son amplias: humanos, animales domésticos, aves de corral y animales silvestres. Los hábitats donde se encuentra esta especie son: madrigueras de ratas de campo y armadillos, gallineros, tecorrales (bardas de piedra) y en la vivienda humana. La fuente de alimentación de los triatóminos es un criterio para conocer la dinámica en la que se está llevando a cabo la transmisión de *Trypanosoma cruzi*. En un estudio de Bautista et al. (2001), se encontró que *M. pallidipennis* no tiene una fuente de alimentación predilecta, sin embargo, se nota una preferencia mayor por la sangre de ratón, lo que confirma que es una especie heterótrofa y esto de alguna manera participa en la transmisión de *T. cruzi* al humano. En condiciones selváticas ha sido encontrada en madrigueras de rata de campo (*Neotoma hallen*) y armadillo (*Dacypus novemcinctus mexicanus*).

Los triatóminos llevan a cabo una metamorfosis incompleta (hemimetábolos), pasan por cinco estadios ninfales en los que presentan alas rudimentarias externas (exopterigotos) antes de alcanzar su estado adulto o imago.

Debido a que se utilizaron los huevos de *M. pallidipennis* para el bioensayo se describen a continuación sus características: el huevo de los triatóminos es elíptico, la variación de la silueta del huevo está en la relación eje mayor-eje menor de la elipse. La región cefálica es más ancha que la caudal. Generalmente los huevos de *M. pallidipennis* miden dos milímetros. En la región cefálica se encuentra un complejo opercular formado por el opérculo, orificio por donde emerge la ninfa 1, el borde opercular, el borde corial y un sistema de orificios: aeropilos y micropilos, cuya función respectivamente es respiratoria y para la fertilización (Aldana, 2008). El cuerpo del huevo está cubierto por una estructura llamada corio, la cual ejerce una función mecánica, resistente, que protege al embrión de situaciones ambientales adversas y está constituido por varias capas de polifenoles y proteínas. La ornamentación del exocorion está constituido por celdas lisas. Los huevos de triatóminos están constituidos, además de las dos capas que forman el corio, de una membrana vitelina (Aldana, 2008). Los huevos son operculados, varían en forma y tamaño según la especie de la cual se trate (Fig. 5). La superficie tiene valor taxonómico, pues tienen diferente arquitectura en su pared. A medida que el embrión se desarrolla se tornan de color rosado o naranja hasta que eclosionan (Carcavallo et al., 1997b). El tiempo de eclosión de los huevos de *Meccus pallidipennis* es de 18 días (rango 16-27) después de su oviposición, el tiempo depende de la temperatura ambiental y especie (Martínez-Ibarra y Katthain-Duchateau, 1999).



Esquemática de los huevos de triatóminos: (A) *Triatoma* Carcavallo et al.,

Los huevos de los insectos tienen una estructura coriónica característica; las diferencias en ornamentaciones de los huevos pueden ser usadas para la diferenciación de especies. Se ha estudiado la morfología de los huevos del género *Meccus*, mediante microscopio electrónico de barrido (Takashi-Obara et al., 2007; Rivas-Hernández, 2011).

En diferentes estados de la República Mexicana, como Morelos, Jalisco, Colima y Michoacán, se ha reportado a *M. pallidipennis* con distintos niveles de positividad a *T. cruzi* que van desde el 23 hasta el 94% (Salazar-Schettino et al., 2005; Cortés-Jiménez et al., 1996). Además, han sido localizados principalmente en el peridomicilio, donde se ha observado el desarrollo de todo el ciclo de vida, ya que se recolectaron desde huevos hasta adultos y se encontró al insecto asociado a animales domésticos como el perro (Magallón-Gastélum et al., 1998; Magallón-Gastélum et al., 2004; Vidal-Acosta et al., 2000; Zárate y Zárate, 1985).

La cutícula del insecto es la primera barrera contra la penetración de insecticidas por contacto y además es la entrada de agentes microbianos. La epicutícula lipídica tiene un papel fundamental en la estabilidad del insecto, contribuye a la estructura de la cutícula y sus propiedades fisiológicas, es una barrera selectiva contra la pérdida de agua y por lo tanto prevenir la desecación (Juárez y Fernández, 2007), es la capa más externa y está cubierta por cadenas largas de hidrocarburos (HC), lípidos (ceras), ésteres grasos y alcoholes grasos; la superficie de hidrocarburos es la mayor barrera protectora (Pedrini et al., 2009).

1.3. ALTERNATIVAS DE CONTROL PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Inicialmente las campañas contra transmisores de *Trypanosoma cruzi* en la década de los 50's utilizaron DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano) (clase II) como activo, cuya falta de actividad triatómica hizo fracasar estas acciones. Tiempo después el HCH (Hexaclorociclohexano) (clase II) fue utilizado en el Cono Sur, y Dieldrin (clase II) en el Norte de Latinoamérica, sin embargo los tratamientos eran muy caros y se necesitaban varias aplicaciones. Durante 1960 y 1970, otros insecticidas organoclorados fueron ensayados contra triatóminos domésticos, además de un gran número de Organofosfatos y Carbamatos (clase I); estos compuestos mataban vertebrados e invertebrados inhibiendo la colinesterasa y la consecuente disrupción del sistema nervioso. En 1980, surgieron los piretroides sintéticos (clase II), mostraron resultados superiores, a bajos costos operativos (Pinchin et al., 1980). Deltametrin y cipermetrin fueron exitosamente aplicados en campo para el control de adultos de *T. infestans*, sin embargo en el estadio de huevo resultaron inocuos. Subsecuentemente, muchos países de Latinoamérica utilizaron piretroides sintéticos de varios tipos, generalmente dando resultados satisfactorios (Schofield y Dias, 1998). Según la clasificación toxicológica de la OMS, los insecticidas se clasifican como: Clase Ia (productos sumamente peligrosos), Clase Ib (productos muy peligrosos), Clase II (productos moderadamente peligrosos) y Clase III (productos poco peligrosos), de acuerdo a su dosis letal media (<http://www.who.int/es/>).

El prolongado e intensivo control de transmisores de *Trypanosoma cruzi* mediante el uso de insecticidas químicos ha generado focos de resistencia a piretroides (Dieldrin) en *Rhodnius prolixus* en Venezuela y a *Triatoma infestans* en Brasil (Zerba, 1999), en Bolivia y en Argentina (Schofield, 2001). En México se ha evaluado la eficacia del piretroide “Cyflutrin” en Yucatán para el control de *Triatoma dimidiata*; los resultados mostraron que después de la aplicación del insecticida hubo re-infestación por adultos al cabo de cuatro meses (Dumonteil et al., 2004), al igual que en Veracruz con resultados similares, resaltando que los piretroides no tienen ningún efecto en los huevos (Rojas-Wastavino et al., 2004). Para el control de *Meccus pallidipennis* se han utilizado piretroides sintéticos (bifentrin, cyflutrin y deltametrin(clase II), señalando re-infestación a los 12 meses; por lo que se están buscando estrategias de control ambientalmente seguras contra insectos transmisores y plagas agrícolas, utilizando agentes microbianos, entre los que están los hongos entomopatógenos.

El término “control biológico” fue usado por primera vez por Smith en 1919, para referirse al uso de enemigos naturales (introducidos o manipulados) para el control de insectos plaga (Barrera, 2007). El término plaga es un concepto creado por el hombre para referirse a cualquier organismo que perjudica su alimento, vivienda, vestido y salud. Las plagas sólo se encuentran en sistemas modificados por el hombre, como áreas urbanas, agroecosistemas, etc. En la naturaleza no existen plagas, sólo consumidores que viven a expensas de productores (Rodríguez-Del Bosque, 2007).

En 1977, en Argentina se realizó el primer intento de control biológico de triatóminos en Argentina, contra *Triatoma infestans*, utilizando al depredador *Telenomus fariai* (Hymenoptera: Scelionidae), sin embargo, sólo era específico contra el estadio de huevos de triatoma y de otros insectos. En 1999, éste mismo método fue utilizado en Guatemala contra *Triatoma dimidiata*. Se ha evaluado el uso de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) contra *Rhodnius prolixus*; en Brasil, se ha hecho uso de inhibidores de crecimiento de los insectos (ICI) contra *Triatoma infestans*, sin embargo, únicamente causaba fallas en la población más que la muerte del mismo (Coscarón, 1997). Otro método utilizado contra el transmisor es “triatoma virus (TrV)” en Argentina, sin embargo, el problema serio que se enfrenta es la necesidad de la ingestión de este por los insectos para su éxito (<http://www.redtrv.org>). En la década de los ochentas se iniciaron los primeros ensayos biológicos con hongos entomopatógenos para el control de triatóminos en América del Sur (Romaña et al., 1987).

1.4. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

En México, el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) en Tecomán, Colima, cuenta con aislados nativos de hongos entomopatógenos provenientes de diferentes hospederos y cultivos. Estos aislados han sido estudiados conjuntamente con el laboratorio de Micología Básica del Depto. de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, para evaluarlos *in vivo* (Toriello et al., 2009) y genotípicamente (Navarro-Barranco et al., 2006). Además, se conoce su virulencia en insectos (Zavala-Ramírez, 2005; Castellanos-Moguel, 2006), su inocuidad para mamíferos (Toriello et al., 2006; Mier et al., 2005) y se ha reportado de bajo impacto a insectos que no son el objetivo blanco de los hongos (Zimmermann, 2007; 2008). Las especies fúngicas más utilizadas como agentes microbianos se encuentran en varios géneros como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *M. acridum*, *Lecanicillium lecanii* e *Isaria fumosorosea*, entre muchas otras. Estas especies han sido utilizadas para el control biológico de plagas agrícolas, así como en el inicio de estudios para el control de insectos transmisores de enfermedades (Luz et al., 1998a; Pedrini et al., 2009; Lazzarini et al., 2006).

El mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos consiste en la adhesión, penetración, diseminación y salida del hongo del insecto (Charnley y St. Leger, 1991) (Fig. 6). Cuando el conidio se adhiere a la cutícula del insecto, éste germina desarrollando un apresorio (estructura de adhesión y penetración). La cutícula es penetrada por una combinación de presión mecánica y la acción de enzimas que degradan la cutícula, como son las proteasas (Pr1 y Pr2) y quitinasas. El hongo prolifera por crecimiento vegetativo en el hemocele del hospedero y se producen conidios externos hasta la muerte del hospedero (Fig. 6). La cutícula del hospedero es la primera línea de defensa contra la infección y tiene un papel central determinando la especificidad fúngica. Si el hongo penetra la cutícula, una infección exitosa puede resultar si el hongo puede vencer la respuesta inmune innata del insecto. Los insectos responden de forma celular y humoral hacia una infección fúngica, con activación inmune, se presenta tan pronto como ocurre la degradación de la cutícula, durante el paso de la penetración. Los hongos tienen dos estrategias principales para vencer la respuesta de defensa del hospedero; el desarrollo de formas de crecimiento crípticas que son enmascaradas efectivamente de la respuesta de defensa del insecto y producción de sustancias inmunomodulantes que suprimen el sistema de defensa del hospedero (Thomas y Read, 2007a).

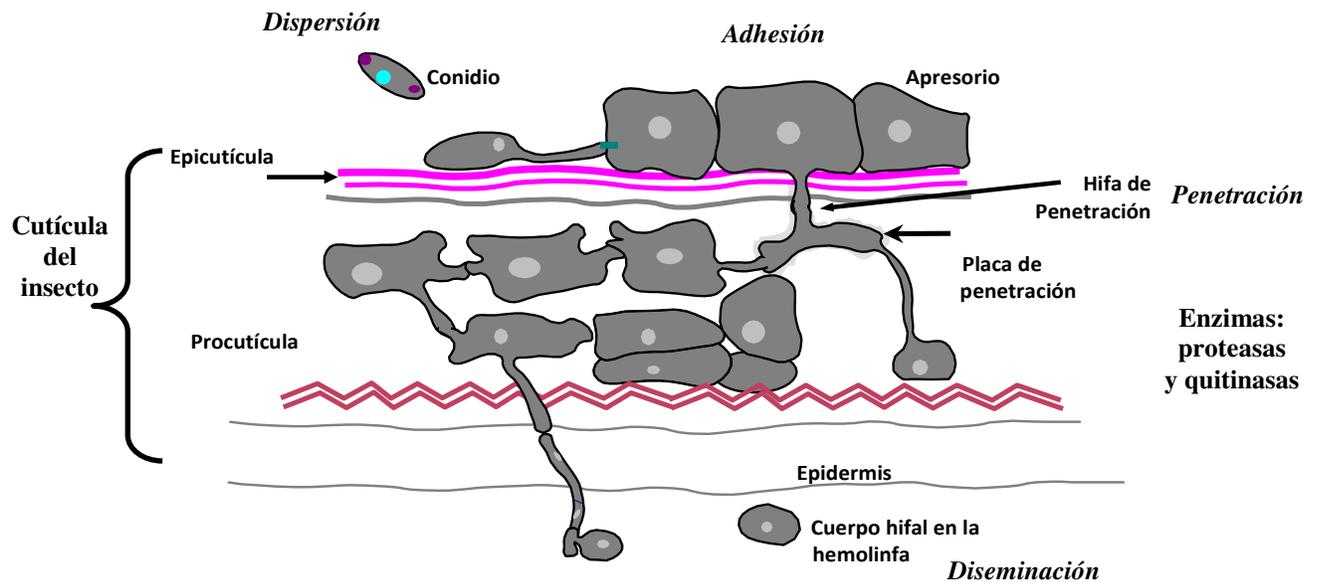


Figura 6. Esquema general del mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos (modificado de Charnley y St. Leger, 1991).

Los hongos entomopatógenos atacan de manera natural a muchas especies de insectos, y en algunos aspectos son muy adecuados para su desarrollo como biopesticidas. Estos hongos pueden ser producidos en masa *in vitro*, almacenados por largos períodos, y sus esporas aplicadas con equipos convencionales. De manera diferente a los virus y bacterias, que necesitan ser ingeridos para infectar a los insectos, los hongos infectan por contacto externo. Y comparado con la mayoría de los insecticidas químicos, los hongos son menos tóxicos a los mamíferos y con un impacto ambiental insignificante. La eficiencia del control biológico a largo plazo es determinante clave en la frecuencia de re-tratamiento necesaria para el control de enfermedades producidas por transmisores, como Chagas, Malaria y Dengue. Estas nuevas estrategias podrían abrir el camino para un biocontrol más efectivo tanto, de insectos de plagas agrícolas como para aquellos que son de importancia médica (Wang y St Leger, 2007).

Entre algunos hongos entomopatógenos de relevancia como agentes microbianos en el control biológico, se encuentra la especie *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) que fue descrita por primera vez por Wize en 1904. Tiempo después, basados en el estudio monográfico del género *Paecilomyces*, fue incluida dentro de este por Samson en 1974 y nombrada como *Paecilomyces fumosoroseus*. Sin embargo, otro estudio sobre la revisión taxonómica y re-clasificación del género *Paecilomyces* y el status de *Isaria*, resultaron en una nueva transferencia de muchas especies del género *Paecilomyces* al género *Isaria*; actualmente *Isaria fumosorosea* se sitúa en la familia Cordycipitaceae, dentro del orden de los Hypocreales (Ascomycota). Este hongo fue aislado por primera vez de una larva de la remolacha del azúcar, *Cleonus punctiventris*, en Ucrania y es un hongo de rápido crecimiento que produce primero colonias de color blanco con cambio de tonalidades desde el púrpura al rosa (Zimmermann, 2008) (Fig. 7) (Tabla 3).

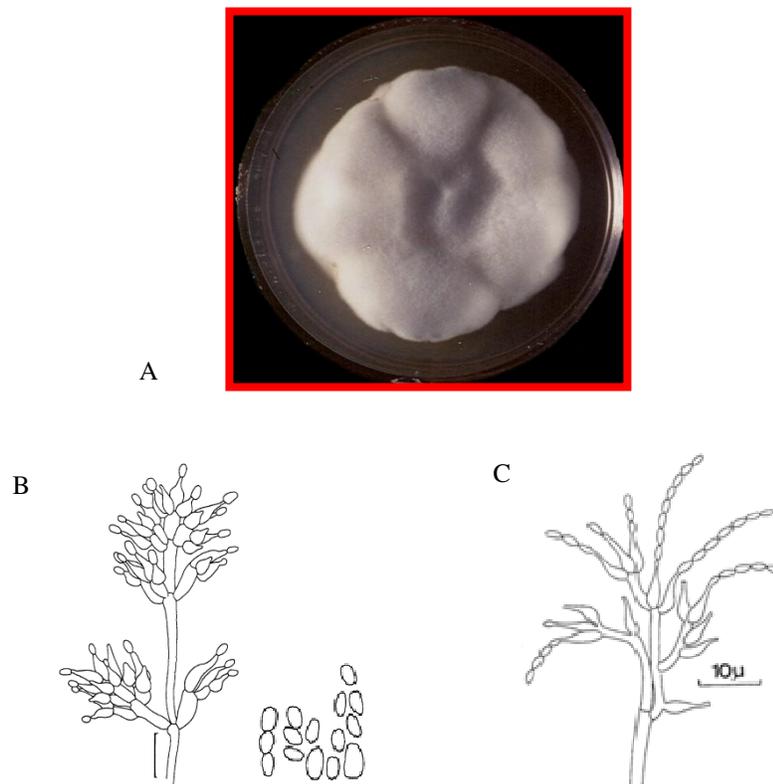


Figura 7. *Isaria fumosorosea*. (A) Aspecto macroscópico de la colonia (Cortesía de la Dra. Conchita Toriello, Lab. de Micología básica, Facultad de Medicina, UNAM). (B-C) Morfología del conidióforo, fiálides y conidios (Domsch et al., 1980; Barron, 1983).

Desde 1990, estudios extensivos en la existencia de hongos patógenos de mosquita blanca revelaron que *I. fumosorosea* es uno de los hongos entomopatógenos más comunes que ataca ninfas y adultos de *Bemisia* spp. y *Trialeurodes vaporariorum*, los cuales se distribuyen principalmente en regiones tropicales y sub tropicales. En *Bemisia*, *I. fumosorosea* ha sido capaz de causar epizootias en EUA, México e India y además ha sido aislado de ácaros, dípteros, hemípteros e himenópteros.

Isaria fumosorosea tiene un amplio rango de hospederos, principalmente del orden Lepidoptera, es un patógeno de alrededor de 40 especies de insectos, y es uno de los hongos patógenos más comunes que causan infección rápida y muerte en la mosquita blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Es responsable de epizootias que pueden afectar significativamente poblaciones de insectos en el campo. En términos de rangos de temperatura para su crecimiento ésta especie es mesofílica (es decir que crece a moderadas temperaturas) y las tasas de crecimiento óptimas se ubican entre los 20-30°C.

Se han desarrollado varios biopesticidas que contienen únicamente *I. fumosorosea* o en combinación con otros entomopatógenos (*M. anisopliae* y *B. bassiana*) en Estados Unidos de América, Europa, India y Sudamérica (Colombia, México, Venezuela) para combatir plagas agrícolas (Zimmermann, 2008). Actualmente, el hongo *I. fumosorosea* está registrado como un micopesticida y está bajo desarrollo comercial para el control biológico de la mosquita blanca. Este hongo es actualmente utilizado en México, Venezuela y en los Estados Unidos de América como una alternativa ambientalmente aceptable a pesticidas químicos para plagas agrícolas.

Otro hongo entomopatógeno ampliamente utilizado como agente microbiano es *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae), distribuido mundialmente en el suelo y que exhibe un amplio rango de hospederos insectos. Fue descrito por primera vez, bajo el nombre de *Entomophthora anisopliae* (Zimmermann, 2007), como patógeno del escarabajo del trigo en 1879 por Metschnikoff, y después como *M. anisopliae* por Sorokin en 1883. Driver et al. (2000), reclasificó el género *Metarhizium* utilizando datos de secuencia del ITS y de la región 28S ADNr D3 y patrones de RAPD revelando 10 clados distintos. *M. anisopliae* var. *anisopliae* corresponde al clado 9. Bischoff et al. (2009) realizaron un análisis filogenético multigénico, con base a genes que codifican para EF-1 α , RPB1, RPB2 y β -tubulina, y sus resultados apoyan la monofilia de nueve taxa terminales en el complejo de *M. anisopliae*.

Este hongo ha sido considerado seguro y ambientalmente aceptado como una alternativa a pesticidas químicos. En años recientes ha sido registrado como agente microbiano o está bajo desarrollo comercial para el control de varias plagas.

M. anisopliae ha sido aislado en México de la plaga del maíz, *Phyllophaga* sp. (Coleoptera: Melolonthidae) y de la plaga denominada comúnmente mosca pinta o salivazo de los pastos, que comprende principalmente dos géneros: *Aeneolamia* sp. y *Prosapia simulans* (Hemiptera: Cercopidae), el cuál ataca particularmente la caña de azúcar.

Estudios de termotolerancia indican que la temperatura óptima de crecimiento de los aislados de *M. anisopliae* procedentes de México es de 25 a 30 °C, lo que sugiere la aplicación de este hongo en zonas climáticas acordes (Navarro-Barranco et al., 2006). Este hongo desarrolla colonias de color verde, a veces de color sepia o isabelino, y sus características morfológicas se describen en la Tabla 3 (Domsch et al., 1980; Tulloch, 1976) (Fig. 8).

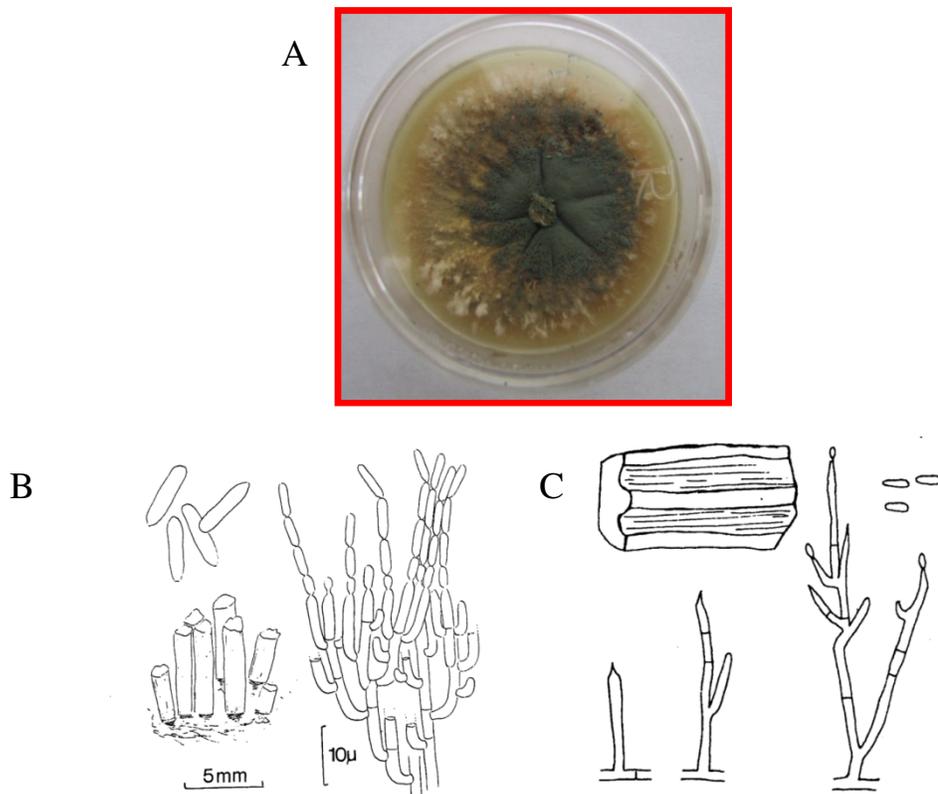


Figura 8. *Metarhizium anisopliae*. (A) Aspecto macroscópico de la colonia (Cortesía de la Dra. Conchita Toriello). (B-C) Morfología del conidióforo, fiálides, conidios y columnas de conidios (Watanabe, 1994; Barron, 1983)

En la Tabla 3 se pueden observar las principales características de estas dos especies fúngicas de relevancia para el control biológico de insectos.

Tabla 3. Principales características de los hongos entomopatógenos *I. fumosorosea* y *M. anisopliae*

CARACTERÍSTICA	HONGO ENTOMOPATÓGENO	
	<i>Isaria fumosorosea</i> (Wize)	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin
Morfología de conidios	Conidios en cadena, cilíndricos a fusiformes	Basípetos catenulados, fialosporas cilíndricas
Tamaño de conidios	3-4 x 1-2 µm	6.3 – 9.8 x 2.1 -2.5 µm 5.0 – 8.0 x 2.5 – 3.5 µm
Conidióforo	Bien desarrollados, simples o ramificados, septados y hialinos. Las fiálides tienen una porción basal globosa.	De 40-80 µm de alto. Simples o ramificados. Fiálides apicalmente puntiagudas de
Hábitat	Suelos boscosos	9.7 – 35.3 x 2.1 -2.7 µm. Suelos boscosos
Color de colonias	En APD de color blanco, con cambio de tonalidades desde el púrpura al rosa	En APD de color verde amarillento. En ocasiones en tonos más oscuros de verde, sepia o isabelino.
Temperatura	25°C	25°C
Humedad	60 % RH	60 % RH

Tomado de Watanabe, 1994; Barron GL, 1983; Domsch, 1980

1.5. INOCUIDAD EN VERTEBRADOS E INVERTEBRADOS NO BLANCO. IMPLICACIONES ÉTICAS.

La habilidad de los entomopatógenos para infectar insectos está usualmente restringida dentro de un grupo de hospederos. Sin embargo, el desarrollo y uso de hongos como agentes microbianos para control de plagas requiere de diversos estudios para determinar su potencial perjudicial para animales y humanos. Cuando un entomopatógeno es producido en masa, los problemas en su seguridad deben ser expresados; las pruebas de seguridad son una vía para producir los datos necesarios para direccionar estas preocupaciones. El desarrollo de cualquier agente biológico de control debe ser monitoreado y manejado cuidadosamente durante su producción y aplicación en cultivos, tomando en cuenta sus riesgos potenciales y problemas de seguridad para evitar posibles riesgos en la salud, especialmente en vertebrados y humanos (Siegel, 1997).

Diversos países y organizaciones: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Organización Mundial de la Salud (WHO), Grupo Internacional de Asociaciones Nacionales de Fabricantes de Productos Agroquímicos (GIFAP), Organización Internacional de Control Biológico (IOBC), Agencia de Protección del Ambiente (EPA) de Estados Unidos, Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OECD) de la Unión Europea, han contribuido al desarrollo de procedimientos para el registro de plaguicidas microbianos (bioinsecticidas). En el documento de la “Guía de Requerimientos para el Registro de Plaguicidas Microbianos” de la OECD (OECD Series on Pesticides, No. 18) de enero de 2003, se enlistan los puntos que de acuerdo a las autoridades que regulan las normas sobre plaguicidas de la mayoría de los países miembros de la OECD deberían conformar un expediente de un plaguicida microbiano. Entre estos puntos se encuentran los datos toxicológicos e información sobre datos de la exposición al agente microbiano, estudios sobre su destino y comportamiento en el ambiente, estudios toxicológicos e información resumida del impacto y riesgo del agente al ambiente.

En contraste con hongos entomopatógenos bien conocidos como: *B. bassiana* y *M. anisopliae*, existen pocas investigaciones sobre el efecto de especies de *Isaria* contra organismos benéficos y que no sean blanco. Reportes sobre el uso del micopesticida Priority® (*I. fumosorosea*) mencionan que no existe toxicidad de éste a lombrices de tierra, gusanos de seda, abejas y enemigos naturales del algodón (Zimmermann, 2008). En el mismo reporte se menciona que no existe patogenicidad y toxicidad en ratas (oral aguda, intraperitoneal aguda y pulmonar aguda) y ratones (oral aguda), y no se encontró irritación en mucosas o piel en conejos (dermal aguda). Además, no se observó toxicidad oral aguda/patogenicidad en gallinas y palomas, y baja toxicidad en peces de

agua dulce. Hasta el momento, se ha mostrado que este hongo no es tóxico para aves, mamíferos o humanos (Zimmermann, 2008).

La bioseguridad de otro hongo entomopatógeno, *M. anisopliae*, también ha sido establecida, utilizando mamíferos y modelos de vertebrados, tales como aves, peces, ratones, conejos, ratas y reptiles, desde 1968 hasta 1983. Pruebas de seguridad en mamíferos (roedores y conejos) utilizando inhalación, exposición subcutánea, intraperitoneal e intraocular no han demostrado efectos adversos o infección.

En México también se han desarrollado protocolos de bioseguridad con hongos entomopatógenos. Entre éstos, se encuentran los estudios de patogenicidad y toxicidad en animales de experimentación de las cepas EH-506/3 de *I. fumosorosea* (Mier et al. 2005) y EH-479/2 de *M. anisopliae* (Toriello et al., 2006), ambas aisladas de insectos en México, en los cuales se demostró la inocuidad de ambas cepas.

Actualmente, los hongos entomopatógenos han sufrido diversas reclasificaciones taxonómicas. Las clasificaciones más recientes que conciernen a *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* corresponden a Humber et al (2010) y Bischoff et al. (2009), las cuales se seguirán en este trabajo y corresponden a: *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) y *Metarhizium anisopliae* (= *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*).

2. ANTECEDENTES

2.1. CONTROL BIOLÓGICO EN PLAGAS AGRÍCOLAS

Los insectos pueden ser infectados por bacterias, virus, protozoarios y patógenos fúngicos. De éstos, los hongos entomopatógenos son quizás los más adecuados para su desarrollo como bioplaguicidas porque no requieren ingestión por el hospedero. En su lugar, estos hongos infectan por contacto externo. El tiempo tomado para matar al hospedero después de la infección varía de dos a cinco días hasta unas pocas semanas, dependiendo de la combinación particular hospedero/patógeno y de las condiciones ambientales (Thomas y Read, 2007b).

Algunos productos de bioplaguicidas han sido ampliamente utilizados, en vista de su potencial para el control de insectos plaga. A una escala global, la penetración de la tecnología del biocontrol dentro del mercado de plaguicidas ha sido mínima; el control biológico constituye menos del 2% de las ventas mundiales de control de plagas (US\$30 billones anualmente), y más del 70% de esta pequeña proporción son productos basados en la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Thomas y Read, 2007b).

En 1989, en respuesta a las preocupaciones sobre la salud humana, el ambiente y como consecuencia del uso extensivo de insecticidas químicos contra langostas y saltamontes en África, se inició un programa de investigación para desarrollar un plaguicida biológico más sustentable contra estos insectos. El programa se denominó LUBILOSA (Lutte Biologique Contre Les Locustes et les Sauteriaux), fue fundamentado en investigaciones preliminares de una cepa virulenta del hongo entomopatógeno *Metarhizium acridum* y habían demostrado que una formulación de conidios del hongo en aceite podía establecer infección en la langosta en condiciones de humedad relativamente baja. El producto desarrollado fue “Green Muscle”®, el cual ahora ha sido registrado en varios países: Sudáfrica, Zambia, Namibia, Sudán, Mozambique y África. Desde que LUBILOSA finalizó en 2001, varios proyectos han continuado para evaluar el impacto de “Green Muscle” en especies de langostas y saltamontes en África, Australia, Europa y Latinoamérica para optimizar su uso (Fig. 9 A-D).

En 1993, la CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation) colaboró con LUBILOSA para desarrollar un bioplaguicida (basado en una cepa australiana de la misma especie fúngica utilizada en África) para su uso contra langostas y saltamontes, en Australia. En 2005 se registró el producto “Green Guard”®, el cual forma parte integral del control biológico de langostas en Australia (Thomas y Read, 2007b).

La producción de Green Muscle y Green Guard muestra que productos bioplaguicidas efectivos basados en hongos entomopatógenos pueden ser desarrollados con eficiencia. El programa LUBILOSA costó US\$17 millones de dólares, comparado con los US\$ 70-100 millones que son requeridos para desarrollar un nuevo componente sintético de pesticidas (Thomas y Read, 2007b).

Green Muscle y Green Guard mantienen un precio bajo, comparado con la mayoría de insecticidas químicos establecidos, además tienen bajo impacto ambiental y pueden ser utilizados cerca de corrientes de agua, cultivos orgánicos y áreas de conservación, satisfaciendo la demanda de más tecnologías ambientalmente sustentables (Thomas y Read, 2007b).



Figura 9. Control biológico en langostas. El programa LUBILOSA en África (A) desarrolló el bioplaguicida “Green Muscle”® (B) contra *Oedaleus senegalensis* (Orthoptera: Acrididae) (C) a partir de una formulación de *Metarhizium acridum* (D) (<http://www.lubilosa.org>).

De manera más general, los programas de bioplaguicidas en langostas han avanzado nuestro conocimiento en áreas tales como detección, formulación, producción en masa, control de calidad, almacenamiento, aplicación, impacto ambiental, pruebas de seguridad y ecología de la relación patógeno-hospedero. Estos avances técnicos han estado acompañados por desarrollo en áreas como producción comercial y registro de producto.

Por otro lado, en la República Mexicana, también se han utilizado hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas. Por ejemplo, la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) recomienda la aplicación de una cepa nativa de *M. acridum* para el combate de ninfas de *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) conocido comúnmente como langosta voladora, y es una plaga que se alimenta de más de 400 especies de vegetales (maíz, soya, frijol, ajonjolí, algodón, etcétera). La primera aplicación en campo se realizó en 2001 en Tizimín, Yucatán; se trataron con *M. acridum* ninfas I y II en una extensión de 17 ha, se aplicó una dosis de 4×10^{12} conidios/ha de aceite mineral citrolina. Los resultados mostraron una reducción entre 86 y 95% en la dispersión y movimiento de estas langostas (Hernández-Velázquez y Toriello, 2008). En San Vicente, San Luis Potosí, también se realizaron evaluaciones en 2002; las aplicaciones del hongo se llevaron a cabo en 35 ha de un rancho ganadero. El efecto fue similar al observado en Tizimín, Yucatán, en donde la disminución de las ninfas de *S. piceifrons* se inicia a los siete días y alcanza el máximo efecto entre 12 y 14 días posteriores a la aplicación (Hernández-Velázquez y Toriello, 2008). En 2002, también se evaluaron tres dosis de la cepa MaPL32 del hongo *M. acridum* en 12 ha en Estación Cuauhtémoc, Tamaulipas, con mortalidades del 90% en las tres dosis después de 12 días (Hernández-Velázquez y Toriello, 2008).

Los beneficios ecológicos de la implementación del control biológico de langosta y chapulín son incalculables, ya que se reduce significativamente la aplicación de insecticidas y se evita el impacto negativo sobre la salud de los trabajadores agrícolas. Los resultados obtenidos permiten concluir que los aislamientos de *M. acridum* detectados en México sobre langosta presentan especificidad a los acrididos, lo que permite ubicarlos como candidatos ideales para ser utilizados en forma inundativa en el manejo de la langosta *S. piceifrons* (Hernández-Velázquez y Toriello, 2008). Con este hongo se han llevado a cabo diferentes protocolos de bioseguridad en diversos órdenes de insectos, crustáceos, aves, y reptiles, donde se muestra la inocuidad de la especie fúngica (Toriello, 2003).

Recientemente en México se probaron tres aislamientos de *M. anisopliae* y tres aislamientos de *B. bassiana* contra adultos de *Dalbulus* spp. (Hemiptera: Cicadellidae),

comúnmente denominada chicharrita del maíz, la cuál es la plaga más importante de este cereal, reportaron que el aislamiento M362 de *M. anisopliae*, de la Colección de Hongos Entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de control biológico, produjo la mayor mortalidad (40.1%) de *D. maidis* a los 25 días después de la aspersión. Este aislamiento mató significativamente más rápido a los adultos y tuvo el mayor porcentaje de esporulación (Moya-Raygoza, 2008). Una de las especies de hongo más utilizada en el manejo integrado de plagas (MIP) es *Metarhizium anisopliae*, patógeno de la mosca pinta o salivazo de los pastos, que afecta grandes cultivos de caña (Fig. 10 A-B) (Montoya-Sansón, 2006). Otra plaga agrícola, la mosquita blanca de los invernaderos, *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae), se ha convertido en una seria amenaza para la agricultura mundial. En estados de la República Mexicana como Morelos, Puebla, México e Hidalgo, donde la agricultura es principalmente de temporal, los daños causados por *T. vaporariorum* son frecuentemente severos (Fig. 10 C-D), además de ser transmisor de geminivirus. Resultados positivos en el control de *T. vaporariorum* se han obtenido con la aplicación combinada de los hongos entomopatógenos *Aschersonia aleyrodis*, *Isaria fumosorosea* y *Beauveria bassiana* (García-Valente y Ortega-Arenas, 2008). Estos son algunos ejemplos de la utilización de especies fúngicas en el control biológico de plagas agrícolas en México.



Figura 10. Casos de control biológico en México. (A) Mosca pinta o salivazo de los pastos (Hemiptera: Cercopidae). (B) Infectada con *M. anisopliae*. (C) *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). (D) Infectada con *Isaria fumosorosea*. Cortesía de la Dra. Conchita Toriello, Lab. de Micología básica, Facultad de Medicina, UNAM.

2.2. CONTROL BIOLÓGICO EN INSECTOS TRANSMISORES DE ENFERMEDADES PARASITARIAS

Los casos anteriores del uso de agentes microbianos para plagas agrícolas proveen un fundamento sólido para el desarrollo de bioplaguicidas basados en hongos para ser utilizados en estrategias integrales para el control de enfermedades, tales como Chagas, malaria, dengue y leishmaniasis (Thomas y Read, 2007b).

Un componente clave del control integral de enfermedades transmitidas por insectos tales como malaria y dengue es el uso de insecticidas que tienen como blanco estos transmisores. Sin embargo, la utilidad de estos insecticidas está siendo cuestionada por problemas de resistencia en los insectos, contaminación ambiental y riesgos para la salud humana (Thomas y Read, 2007b).

Scholte et al. (2005) han resaltado el uso potencial de hongos entomopatógenos para matar mosquitos adultos transmisores de malaria, infectaron insectos exponiéndolos a formulaciones de aceites con conidios, aplicadas en superficies donde los mosquitos adultos descansan después de alimentarse. Scholte et al., 2003 realizaron bioensayos en el laboratorio y mostraron que los mosquitos se infectaron por la exposición a hongos entomopatógenos, causando el 100% de mortalidad en adultos de *Anopheles* y *Culex* spp. entre los siete y 14 días, dependiendo de la dosis, formulación y cepa fúngica. Blandford et al. (2005) utilizaron un modelo murino de malaria para examinar el efecto de la infección fúngica en el potencial de transmisión de la malaria. Los resultados indicaron reducción de hasta 80 veces el número de mosquitos capaces de transmitir malaria después de su exposición al hongo patógeno.

Scholte et al. (2005) señalaron que en el biocontrol de transmisores de enfermedades, no es necesario matar rápidamente al transmisor con el patógeno virulento, más que eso, se enfatiza en el potencial de los entomopatógenos para influenciar el comportamiento del insecto y de una forma más sutil que puede afectar negativamente la transmisión de la malaria sin necesidad de reducir la densidad de transmisores. Por ejemplo, numerosos estudios en insectos patógenos han resaltado el potencial de efectos pre-letales (Blandford et al., 2005). Las langostas que se infectan con hongos entomopatógenos desarrollan alteraciones en comportamiento, alimentación, fecundidad, movilidad y respuesta tardía de escape a depredadores antes de que mueran, los mosquitos infectados con entomopatógenos tienden a reducir su alimentación antes de su muerte, y se altera la tasa de sobrevivencia del parásito de la malaria dentro del mosquito.

Al igual que el control de transmisores para la enfermedad de Chagas, el control de la malaria está casi exclusivamente basado en insecticidas químicos, rociado al interior de la vivienda e impregnación de mosquiteros para matar mosquitos adultos en África, sin embargo, el uso continuo de insecticidas ha conducido a un sustancial incremento en la resistencia de los mosquitos (Scholte et al., 2005).

En Tanzania, se infectaron mosquitos adultos al posarse en 3m² de tela de algodón negra impregnada con *M. anisopliae*; de las 580 hembras de *Anopheles gambiae* capturadas, 132 estaban infectadas con *M. anisopliae*. Los valores de tiempo letal medio fueron de 3.70 días en machos y 3.49 días en hembras, Scholte et al. (2005) concluyeron que la aplicación de entomopatógenos puede reducir la transmisión del parásito y reducir el riesgo de contraer malaria. En este mismo lugar Lwetoijera et al. (2010) demostraron que con conidios de la cepa IP 46 de *Metarhizium anisopliae*, liberados dentro de una estación peridomiciliada, podía infectar una alta proporción de transmisores adultos de la malaria, *Anopheles arabiensis*; utilizando una concentración de 3.9×10^{10} conidios/m², más del 95% de mosquitos murieron dentro de 14 días posteriores a la exposición.

Otra enfermedad parasitaria es la leishmaniasis, transmitida por la picadura de flebótomos infectados que pertenece al género *Phlebotomus* y *Lutzomya* en el Viejo y Nuevo Mundo, respectivamente. En el control biológico de flebotómos como *Lutzomya longipalpis* (Diptera: Psychodidae), transmisor de la leishmaniasis visceral, se ha estudiado el efecto de *M. acridum* en huevos, larvas y adultos a concentraciones de 1×10^4 a 1×10^8 conidios/ml. Los resultados presentados en este estudio sugieren baja virulencia de *M. acridum* contra huevos y larvas de *L. longipalpis*, por lo cual no podría ser utilizado en estos estadios. Sin embargo, en términos de mortalidad de adultos y fecundidad de hembras infectadas, los resultados fueron significativos (Albano-Amóra et al., 2010).

En otro estudio se probaron 16 aislados de *M. anisopliae* y tres de *B. bassiana* contra adultos de *Phlebotomus duboscqui*, los cuales fueron susceptibles a la infección fúngica con mortalidades que van del 76.8-100% en 12 días posterior al tratamiento. El TL₅₀ varió de 3.0 a 7-8 días y el TL₉₀ de 5.3 a 16.2 días en todos los aislados fúngicos. Los aislados más virulentos causaron mortalidades que van desde el 97.5%-100% entre 5.3 a 9.6 días (Ngumbi et al., 2011).

Otra enfermedad transmitida por insectos es la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, en ésta, los hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* han sido reportados como altamente virulentos en condiciones de laboratorio contra *Triatoma infestans*, y otras especies de triatóminos, además, estos hongos entomopatógenos tienen la capacidad de reproducirse sobre sus cadáveres (Luz et al., 1999a).

Los primeros ensayos biológicos con hongos entomopatógenos para el control de triatóminos se realizaron en la década de los ochentas por Romaña et al. (1987). En este estudio se evaluó la patogenicidad de 14 aislados de cinco especies de hongos entomopatógenos: *Beauveria bassiana*, *B. brogniartii*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi* e *Isaria fumosorosea*, en ninfas de primer estadio de *Rhodnius prolixus*. Todas las cepas de hongos se probaron a una dosis de 3×10^5 conidios/mL, de estas cinco especies sólo cuatro resultaron efectivas causando porcentajes de mortalidad variables: los aislados de *B. bassiana* números 297 y 326 causaron el 100% en tan sólo 15 hora, con el aislado número 56 de *P. fumosoroseus* fue de 80-100% en xxx , con los aislados números 9 y 13 de *N. rileyi* fue de 65% y 50% en xxxxx respectivamente y el aislado número 149 de *M. anisopliae* fue de 55%; en los demás aislados, la mortalidad fue menor del 50% (Romaña et al., 1987).

Se llevaron a cabo ensayos en campo en un área central de Brasil (Sao Luis de Montes Belos, Goiás) para el control peridoméstico de *T. sordida* con formulaciones de aceite y *B. bassiana* (10^6 conidios/cm²) en gallineros contruidos a base de ladrillos sueltos, tejas, tablonos de madera y fragmentos de bolsas negras; los resultados mostraron que las poblaciones peridomésticas de *T. sordida* pueden reducirse después de la aplicación de *B. bassiana*, sin embargo, no pudieron ser eliminadas permanentemente en las áreas tratadas con hongos. Investigaciones en la actividad de los hongos entomopatógenos en triatóminos bajo condiciones de campo son importantes para evaluar su potencial en el control biológico de estos transmisores. Luz et al. (2004) en su estudio señalaron que los resultados obtenidos en el laboratorio no son reproducibles en el campo, donde las interacciones entre patógenos, transmisores y ambiente son complejos. La baja actividad de *B. bassiana* en su estudio pudo ser debido a condiciones de humedad no óptimas.

Los hongos entomopatógenos son candidatos promisorios para el control biológico de triatóminos, porque invaden a su hospedero a través del integumento. Sin embargo, la humedad relativa (HR) y temperatura son factores ambientales limitantes para el desarrollo fúngico en insectos. Se evaluaron in vitro 23 aislados de *B. bassiana* y 13 aislados de *M. anisopliae* en ninfas de tercer estadio de *T. infestans*, para conocer si las altas tasas de infección de triatóminos por

hongos entomopatógenos dependía de la humedad. La mayoría de los aislados utilizados en este estudio fueron obtenidos originalmente de insectos hemípteros en Brasil. Los resultados mostraron que a una humedad relativa del 50% la virulencia de la mayoría de los aislados fue reducida y que a humedades relativas del 100% cuatro aislados de *B. bassiana* y dos de *M. anisopliae* causaron mortalidades del 90%, por lo que concluyen que la humedad afecta directamente la mortalidad en triatóminos, y que otros factores que pueden afectar la mortalidad son la temperatura y concentración de conidios (Luz et al., 1998a).

Lo anterior es confirmado en otro estudio al evaluar el mismo transmisor con ambos entomopatógenos pertenecientes a diferentes cepas, en condiciones de laboratorio la mortalidad de estos hongos contra *T. infestans* es muy alta a humedades cercanas a la saturación y existe una reducción de la mortalidad a humedades relativamente bajas (Lazzarini et al., 2006).

Es un hecho que el control de triatóminos depende de acciones coordinadas e integradas, dirigidas a mejorar las condiciones culturales y socioeconómicas, además del uso de métodos de control más eficientes y menos tóxicos, *B. basianna* se encuentra entre los entomopatógenos más utilizados en bioensayos, por ejemplo, Lecuona et al. (2001) estudiaron el efecto cuatro cepas aisladas en Argentina en ninfas y adultos de *T. infestans*, la mortalidad en ninfas fue del 100% y el TL₅₀ entre 6.5 y 7.3 días. La mortalidad en adultos fue del 75-100% con un tiempo letal medio entre 4.8 y 7.5 días. Tres de estas cepas fúngicas fueron aisladas de lepidópteros y solo una de hemípteros. La DL₅₀ varió entre el 1.6×10^6 - 21.7×10^6 . Además, mencionan que más que la humedad la temperatura puede ser un factor limitante para el uso de hongos entomopatógenos, ya que sus mortalidades más altas ocurrieron a temperaturas de 26°C (la óptima para este hongo).

Marti et al. (2005) realizaron un estudio sobre hongos entomopatógenos aislados de *Triatoma infestans* entre los años 2001-2003 en un área endémica de Chagas en Argentina; el objetivo fue aislar e identificar cepas de hongos entomopatógenos que infectan *T. infestans* en la naturaleza y probar la patogenicidad de este hongo. De un total de 301 adultos y 274 ninfas de *T. infestans* colectadas en nueve provincias de Argentina: 10 adultos (3.3%) y cuatro ninfas de quinto estadio presentaron un hongo filamentoso identificado como *Beauveria bassiana*.

Luz et al. (2003) reportaron el aislamiento de un hongo entomopatógeno a partir de un espécimen muerto de *T. sordida* (Sao Luis de Montes Belos, Goiás, Brasil) y su actividad contra ninfas de *T. infestans*. Se estudiaron un total de 64 especímenes de triatóminos colectados en áreas domésticas y peridomésticas, sólo se obtuvo un aislado de un cadáver de ninfa de cuarto estadio, la identificación morfológica del hongo mostró ser una especie de *Evlachovaea* (Hyphomycetes). Una razón por la cual no se pudieron aislar más hongos entomopatógenos es que éstos compiten con hongos saprobios y otros organismos en los cadáveres de triatóminos. El aislado de *Evlachovaea* sp. mostró alta actividad contra ninfas de tercer estadio de *T. infestans* a humedades cercanas a la saturación. La mortalidad de ninfas se observó de 6-8 días después de la aplicación de *Evlachovaea* sp. y una mortalidad del 97.5% a los 20 días. Al igual que *B. bassiana* la actividad de *Evlachovaea* sp. depende de la humedad, ya que estos resultados se alcanzaron con una humedad relativa del 98%; estas especies por lo tanto pueden ser de uso potencial para controlar poblaciones de transmisores peridomésticos durante épocas de lluvia.

Marti et al. (2005) lograron aislar de poblaciones domésticas y peridomésticas de *T. infestans* (colectados en El Quebracho, Santiago del Estero, Argentina) un hongo identificado como *Paecilomyces lilacinus*; la viabilidad de sus conidios fue del 93.83% a las 24 h y el tiempo letal medio de adultos de *T. infestans* expuestos a una suspensión de *P. lilacinus* fue de 12.8 días y 100% de mortalidad a los 30 días posterior al tratamiento.

Otros hongos que se han utilizado en bioensayos son *Aspergillus giganteus* y *Penicillium corylophilum* en ninfas de primer y cuarto estadio de *T. infestans* y *Panstrongylus megistus*. Lara Da Costa et al. (2003) demostraron en su estudio que la mortalidad de las ninfas inició a las 48 h después de su incubación con los conidios, se observó la mortalidad en ninfas durante 21 días. Concluyeron que su método de pulverización con tween 80 es efectivo porque provee mayor adherencia de los conidios al cuerpo del insecto, ya que los conidios son hidrofóbicos y el agua no permite gran adherencia del conidio a la cutícula del insecto. De las dos especies de hongos, *A. giganteus* es más efectiva contra ninfas de primer (67%) y cuarto estadio (33%) de *T. infestans*. La cepa de *P. corylophilum* fue efectiva para ninfas de *T. infestans* del primer (62%) y cuarto estadio (40%). Respecto a *P. megistus*, las ninfas de primer estadio fueron altamente susceptibles con *P. corylophilum* (90%), a diferencia de *A. giganteus* para ninfas de primer (10%) y cuarto estadio (8%). Además señalan que solamente los resultados arriba del 50% son considerados efectivos en análisis de mortalidad, ya que solamente arriba de este nivel se consideran agentes promisorios para su uso en control biológico.

Al igual que la temperatura y la humedad son factores importantes para el establecimiento de un método de control biológico con entomopatógenos, la cantidad de conidios producidos es potencialmente importante para la transmisión del hongo hacia otros insectos, por lo que grandes cantidades de conidios originadas de los cadáveres de insectos puede incrementar la transmisión del hongo a otros individuos y así acelerar la propagación de la epizootia. Un aislado fúngico virulento que produce gran cantidad de conidios en el cadáver (esporulación) puede ser considerado para el control de los transmisores de la enfermedad de Chagas. Luz et al. (1999a) señalaron en un estudio sobre la esporulación de *B. bassiana* en cadáveres de *T. infestans*, que una temperatura de 20°C induce una producción significativamente alta de conidios, a diferencia de una temperatura de 30°C, la cual produce menor cantidad de conidios.

Otros géneros de triatóminos como *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* han sido utilizados en bioensayos con *Beauveria bassiana*. Se probaron 25 ninfas de tercer estadio (cuatro repeticiones) a una concentración de 1×10^7 conidios/ml y se obtuvo que sólo *Panstrongylus herreri* mostró una mortalidad del 100%, y un TL₅₀ de ocho días, mortalidades de más del 90% en *Dipetalogaster maxima* (TL₅₀ de 10 días), *Triatoma picturata* (TL₅₀ 10 días) y *Rhodnius robustus* (TL₅₀ de 8 días); más del 80% para *R. prolixus* (TL₅₀ 8 días), *T. infestans* (TL₅₀ 12 días) y *Triatoma brasiliensis* (TL₅₀ 12 días) y más del 70% para *Rhodnius neglectus* (TL₅₀ 9 días) y *Panstrongylus megistus* (TL₅₀ 15 días). Otras especies como *T. leticularia*, *T. matogrossensis*, *T. protracta*, *T. rubrovaria*, *T. vitticeps*, *T. williami* y *Rhodnius nasutus* mostraron mortalidades de menos del 70%. La esporulación de *B. bassiana* en cadáveres después de 10 días difiere significativamente entre estas especies de triatóminos y entre géneros. El número de conidios encontrados en cadáveres varió de 1.77×10^7 (*R. prolixus*) a 8.30×10^7 (*T. williami*). En conclusión todas las especies de triatóminos fueron susceptibles a *B. bassiana*, tanto especies domésticas como peridomésticas (Luz et. al., 1998b).

Se ha estudiado la virulencia y caracterización genética de dos cepas guatemaltecas de *B. bassiana* y dos de *M. anisopliae* para el control biológico de *Triatoma dimidiata*, se observó que presentaron el 100% de mortalidad acumulada. El TL₅₀ de las cepas sobre las ninfas de 1er estadio varió entre 5.5 y 6.6 para *M. anisopliae*, y entre 5.2 a 5.7 días para *B. bassiana*, sugiriendo que las cepas nativas que han sido mantenidas en diversos organismos propios de la misma región tienden a poseer mayor capacidad virulenta (Melgar et al., 2004).

En Venezuela *B. bassiana* ha resultado ser altamente virulenta contra *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata*; este hongo alcanza mayores porcentajes de germinación en el rango térmico de 21-34°C, y a temperaturas extremas de 6 y 40°C se inhibe su germinación. En estas especies se resalta la importancia de investigar entomopatógenos a nivel de laboratorio y de campo, especialmente hacia aquellas de hábitos peridomésticos y selváticos, donde los insecticidas químicos resultan ecológicamente inviables o han resultado poco efectivos o imprácticos en el control de las poblaciones de estos insectos transmisores (Cazorla-Perfetti et al., 2007).

Se ha evaluado también la compatibilidad de diversos aislados de hongos entomopatógenos (*M. anisopliae*, *P. fumosoroseus* y *B. bassiana*) con plaguicidas de uso común en la práctica agrícola, como carbofurán y malatión como insecticidas, benomil (Benlate) y bis-ditiocarbamato de zinc (Manzate) como fungicidas, encontrando en general que los aislados presentaron una mayor inhibición con los insecticidas que con los fungicidas y el fungicida que mejor los inhibe es benomil; los insecticidas redujeron ligeramente la capacidad de esporulación de los aislados. El fenoxicarb ha demostrado ser compatible con *B. bassiana* y *M. anisopliae*, cuando las concentraciones del hongo son altas y las del insecticida bajas (Vázquez et al., 2006)

En base a los resultados anteriormente citados, el uso de los hongos entomopatógenos como método de control biológico tiene un gran potencial en el área de la salud para contribuir a la reducción de las poblaciones de los principales transmisores de *Trypanosoma cruzi*.

3. JUSTIFICACIÓN

La re-infestación de viviendas por transmisores que vienen de hábitats peridomésticos, la resistencia a los insecticidas, contaminación ambiental y riesgos para la salud en el humano está cuestionando el uso de insecticidas químicos y se están buscando nuevas estrategias de control ambientalmente seguras, las cuáles solas o en conjunto con otras estrategias (mejoramiento de la vivienda y educación en la salud) pueden mejorar la calidad de vida de los habitantes de zonas endémicas de Chagas y así controlar a los insectos transmisores.

El biocontrol que utiliza bioinsecticidas basado en patógenos microbianos naturales es un método útil para combatir estos transmisores. Dentro de estos patógenos se encuentran los hongos entomopatógenos como: *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae*, los cuales infectan por contacto externo con el hospedero, no requieren ingestión y es posible reproducirlos en grandes cantidades en el laboratorio a un bajo costo. *Meccus pallidipennis* (Stål, 1872) es una especie endémica de México, que se encuentra distribuida en 13 estados. El huevo es la primera etapa del ciclo de vida de la mayoría de los insectos, y en estudios previos se ha demostrado que los piretroides son ineficientes para este estadio de desarrollo, lo cual puede ser una de las causas de la re-infestación de viviendas.

En este trabajo, se propone el uso de dos cepas nativas aisladas en México de *I. fumosorosea* (EH-511/3) y *M. anisopliae* (EH-473/4) evaluadas fenotípicamente y genotípicamente para bioensayos con el estadio de huevo de *Meccus pallidipennis*, para contemplar su posible uso como alternativa a los insecticidas químicos, en el control biológico de los transmisores de *Trypanosoma cruzi*.

4. HIPÓTESIS

Si los hongos entomopatógenos son capaces de controlar a diversos insectos que son plagas agrícolas y algunas especies de triatóminos, entonces es posible que estos hongos logren en pocos días mortalidades elevadas en el estadio de desarrollo del huevo del ciclo biológico de *Meccus pallidipennis*, para posteriormente lograr un control biológico de estos insectos.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar en condiciones de laboratorio, el porcentaje de mortalidad, el tiempo letal medio (TL₅₀), porcentaje de esporulación y la cantidad de conidios en huevos de *Meccus pallidipennis*, al ser expuestos a dos especies de hongos entomopatógenos, *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Reproducir el ciclo de vida de *Meccus pallidipennis* en condiciones controladas de temperatura y humedad.
- 2) Cultivar dos especies de hongos entomopatógenos, *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae*, en medio de cultivo APD (Agar Papa Dextrosa).
- 3) Comparar el potencial de infección de dos hongos entomopatógenos sobre el estadio de huevos de *M. pallidipennis* para determinar su efectividad en condiciones de laboratorio, mediante la evaluación del tiempo letal medio (TL₅₀), los porcentajes de mortalidad y de esporulación.
- 4) Análisis estadístico (Probit) de los datos de mortalidad para el cálculo de la concentración letal media y tiempo letal medio así como la comparación de la virulencia entre las dos especies fúngicas probadas.
- 5) Realizar microscopía electrónica de transmisión (MET) para observar los efectos patológicos del hongo en el estadio de huevo de *M. pallidipennis*.

6. METODOLOGÍA

6.1. REPRODUCCIÓN DEL CICLO BIOLÓGICO DE *Meccus pallidipennis*

Pie de cría. Se utilizó la colonia de triatóminos del laboratorio de “Biología de Parásitos”, Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM. Esta colonia del laboratorio se estableció en 1996 de especímenes capturados en Cuautla, Morelos. Se seleccionó como material de estudio la especie *M. pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) por ser un insecto peridoméstico, transmisor de la enfermedad de Chagas, amplia distribución en el país, y por su facilidad de cría. A partir de dos parejas de triatóminos adultos se obtuvieron los huevos y estadios ninfales (n1, n2, n3, n4 y n5), se criaron en contenedores cúbicos de vidrio de 7 x 15 cm (diámetro x altura). Los triatóminos se alimentaron cada tercer día sobre ratones CD-1 durante 40 min. Los contenedores con los ejemplares fueron mantenidos en el insectario con condiciones controladas de 26-28°C y 60% de humedad relativa (HR).

Ciclo de desarrollo. Se establecieron los tiempos necesarios para la obtención de los diferentes estadios del insecto a utilizar en los bioensayos con el hongo. Para ello se inició con los huevos ovipuestos por dos parejas de triatóminos adultos. Los huevos fueron agrupados por día de oviposición para iniciar un grupo de 80 huevos. Después de la eclosión, las ninfas de primer estadio (n1), fueron separadas individualmente en frascos de plástico de 7 x 15 cm con una base y acordeón de papel Revolución, con el fin de proveer movilidad a los triatóminos. Tres días después de la eclosión, las ninfas fueron alimentadas individualmente sobre ratones CD-1 durante 40 min y después cada tercer día. Fueron mantenidas en el insectario con condiciones controladas de 26-28°C y 60% de HR y fueron checadas diariamente para registrar su muerte o ecdisis.

Ya establecidos los tiempos necesarios entre cada estadio de desarrollo, se utilizaron sólo los insectos que completaron su estado de desarrollo a adulto (segunda generación filial F2), se colocaron en parejas de adultos para la obtención de huevos y los demás ejemplares se agruparon de acuerdo al estadio de crecimiento (huevos, ninfa 1, ninfa 2, ninfa 3, ninfa 4, ninfa 5 y adultos), bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad mencionadas anteriormente. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa estadístico SPSS Versión 12 (2003), para conocer el promedio de días necesarios entre cambio de estadio.

Oviposición. De las dos parejas de triatóminos adultos iniciales se utilizaron las dos hembras para conocer el número mínimo y máximo de huevos ovipuestos por cada una durante 15 ocasiones. Cada semana se registró el número de huevos ovipuestos por cada hembra, y se realizó un promedio del total de los huevos registrados. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa estadístico SPSS Versión 12 (2003) para conocer el promedio de huevos ovipuestos por cada hembra (Rabinovich, 1972).

6.2. AISLADOS FÚNGICOS (HONGOS ENTOMOPATÓGENOS)

Aislados fúngicos. Se utilizaron dos cepas de hongos entomopatógenos: *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) cepa EH-511/3 (cultivo monospórico) y *Metarhizium anisopliae* (= *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*), cepa EH-473/4 (cultivo monospórico), previamente determinadas en cuanto a su virulencia al insecto, caracterización fenotípica y genotípica e inocuidad en mamíferos (Castellanos-Moguel, 2007, 2008; Mier et al., 2005; Toriello et al., 2003; 2006; 2008). Los hongos están depositados en la colección de cultivos del Laboratorio de Micología Básica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, registrada en la "World Federation of Culture Collections" (WFCC) como BMFM-UNAM 834. Las especies fúngicas se cultivaron en tubos de medio agar papa dextrosa (APD, g/L: papa blanca 300 g, dextrosa (Droguería Cosmopolita, México) 20 g, agar (BIOXON®, México) 15 g y agua destilada 1000 mL) (Anexo 1) e incubados a 28°C durante ocho días (Mier et al., 2002). El origen de cada cepa se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Origen de las cepas de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae*

HONGO	CLAVE *UNAM	CLAVE **CNRCB	INSECTO	ORIGEN	ESTADO
<i>I. fumosorosea</i>	*EH-511/3	**AMBAS2	<i>Bemisia</i> sp. (Hemiptera: Aleyrodidae)	Sandía	Colima, México
<i>M. anisopliae</i>	*EH-473/4	**MaNL1	<i>Aeneolamia</i> sp. (Hemiptera: Cercopidae)	Caña de Azúcar	San Luis Potosí, México

* Laboratorio de Micología Básica, Departamento de Microbiología y Parasitología Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

** CNRCB = Centro Nacional de Referencia de Control Biológico

Suspensión conidial. Todo el procedimiento se llevó a cabo en la campana de flujo laminar. Los conidios se dependieron de la superficie del agar con ayuda de un asa micológica adicionando 3 mL de Tween® 80 al 0.5% (Anexo 1), con una jeringa de plástico estéril de 10 mL. La suspensión obtenida se mantuvo en hielo durante todo el bioensayo, se homogenizó y se realizaron dos diluciones: 1:10 (100 µL de la suspensión de conidios obtenida del agar + 900 µL de Tween® 80 al 0.05%) y 1:100 (10 µL de la suspensión + 990 µL de Tween® 80 al 0.05%). Se contó el número de conidios en cámara de Neubauer, adicionando 15 µL de cada suspensión en cada extremo y contando los cinco campos principales de la cámara. Se ajustó la suspensión para obtener concentraciones de: 1×10^7 , 3×10^6 , 1×10^6 , 3×10^5 y 1×10^5 conidios/mL para el bioensayo de la concentración letal media (CL₅₀) y de 3×10^5 conidios/mL para el tiempo letal medio (TL₅₀).

Viabilidad de conidios. La viabilidad de los conidios que se utilizaron en los bioensayos de CL_{50} y TL_{50} se evaluó por el porcentaje de germinación. Se suspendió una muestra de conidios en Tween® 80 al 0.5% ajustando la suspensión a 1×10^7 conidios/mL y para evitar el conglomerado de conidios se mantuvo en agitación constante (vórtex). De esta suspensión, se tomó una alícuota de 100 μ L y se dispersó con una varilla de vidrio estéril en una caja de Petri con APD y se incubó a 28°C durante 10 h para *I. fumosorosea* y 12 h para *M. anisopliae*. Se examinaron un total de 200 conidios por caja (tres cajas por hongo) utilizando el microscopio con el objetivo de 40 X. El criterio de conidio germinado fue que el largo del tubo germinativo fuera igual o mayor que el largo del conidio (Montoya-Sansón, 2006).

6.3. BIOENSAYOS DE VIRULENCIA: CL_{50} Y TL_{50}

Para medir la virulencia de los hongos entomopatógenos utilizados en el estadio de huevo de *Meccus pallidipennis* se llevaron a cabo dos bioensayos, la CL_{50} , que es la concentración de conidios que mata el 50% de los insectos prueba, y el TL_{50} , que es el tiempo en el cual se muere el 50% de los insectos prueba. La CL_{50} solamente se llevó a cabo con *I. fumosorosea* para conocer la concentración ideal a utilizarse en los bioensayos de TL_{50} y observar de manera adecuada la virulencia y mortalidad acumulada de los insectos. Ya que en ensayos previos, las dosis más altas no permitieron el cálculo del tiempo letal medio.

6.3.1. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL_{50})

Para la CL_{50} se probaron cinco diferentes concentraciones: 1×10^7 , 3×10^6 , 1×10^6 , 3×10^5 y 1×10^5 conidios/mL.

Insectos. Se emplearon 12 huevos viables de coloración blanquecina de una a tres semanas de haber sido ovipuestos por *Meccus pallidipennis*, con tres repeticiones ($n = 36$) para cada concentración de conidios.

Desinfección de los huevos. Los huevos fueron desinfectados utilizando una secuencia de lavados modificada en cajas de Petri de vidrio de 100 x 15 mm (Lacey y Brooks, 1997). La secuencia comenzó con lavados sucesivos, primero en agua destilada estéril, cloro al 4% y finalmente con dos lavados (en cajas distintas) de agua destilada estéril (Anexo 1). La inmersión de los huevos se realizó con la ayuda de una coladera de plástico. El lavado en cada caja fue de un minuto. Al finalizar la secuencia de lavados, los huevos se colocaron individualmente en cajas de Petri de

plástico de 60 x 15 mm con papel filtro estéril (Fig. 11), para secarlos durante una hora en campana de flujo laminar y enseguida infectarlos con la suspensión conidial.



Figura 11. Desinfección de los huevos de *M. pallidipennis*.

Aislado fúngico. Se utilizó la cepa EH-511/3 (cultivo monospórico) del hongo entomopatógeno *I. fumosorosea*, previamente cultivado en tubos de medio APD e incubados a 28°C durante ocho días.

Bioensayo de virulencia. La infección se realizó aplicando 2 μL de la suspensión de conidios de 1×10^7 , 3×10^6 , 1×10^6 , 3×10^5 y 1×10^5 conidios/mL de *I. fumosorosea* con micropipeta en la superficie del huevo. Cada huevo se colocó individualmente en cajas de Petri de plástico con papel filtro estéril y se incubaron a 28°C con fotoperíodo 12 x 12 h (luz- oscuridad). A las 24 h de incubación los huevos infectados se transfirieron a cajas con agar-agua (1%) (Anexo 1), incubándolos con el equipo Precisión 818® a una temperatura de 28°C durante 10 días (Fig. 12).

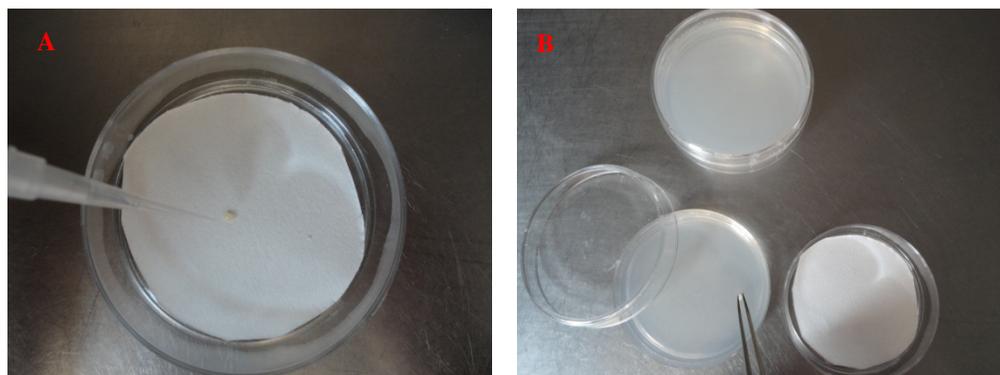


Figura 12. Bioensayo de virulencia. (A) Infección del huevo. (B) Transferencia a cajas con agar-agua (1%).

Testigos. A 36 testigos previamente desinfectados se les aplicó 2 μ L del vehículo Tween 80 al 0.5% en la superficie del huevo y se colocaron en cajas Petri con papel filtro a una temperatura de 28°C durante 10 días, para observar su eclosión a ninfas 1.

Observación de huevos infectados. Se observaron los huevos infectados con el microscopio estereoscópico Olympus SZ40 y se registró la mortalidad por cada concentración de conidios cada 12 horas. El criterio tomado para anotar la muerte de cada huevo fue el siguiente: mediante el microscopio estereoscópico pudimos observar la superficie del huevo (zona de infección); si el crecimiento del hongo se presentaba en otra parte del huevo además del opérculo de dicho organismo se consideraba muerto de acuerdo al proceso invasivo natural del hongo. Los resultados obtenidos se anotaron en una tabla de registro con el fin de determinar la CL_{50} de la población (Anexo 2).

Análisis estadístico. El bioensayo se analizó con el porcentaje de mortalidad acumulada en cada concentración de conidios. Se determinó la CL_{50} realizando un análisis Probit con el programa estadístico Polo Plus® a un nivel de confianza del 95% (Anexo 3) (Mancebo-Markis, 2009; Throne et al., 1995).

6.3.2. TIEMPO LETAL MEDIO (TL_{50})

Después de analizar la CL_{50} obtenida en huevos de *M. pallidipennis* para *I. fumosorosea* se logró establecer la concentración de 3×10^5 conidios/mL para poder obtener el TL_{50} de los hongos, tanto de *I. fumosorosea* como de *M. anisopliae*.

Insectos. Se emplearon un total de 75 huevos viables (25 huevos por tres repeticiones), de coloración blanquecina, de una a tres semanas de haber sido ovipuestos de *M. pallidipennis* para cada hongo entomopatógeno.

Desinfección de los huevos. Los huevos fueron desinfectados de la misma manera que se describió anteriormente para el bioensayo de la CL_{50} .

Aislados fúngicos. Se utilizaron dos cepas de hongos entomopatógenos: *I. fumosorosea* cepa EH-511/3 (cultivo monospórico) y *M. anisopliae*, cepa EH-473/4 (cultivo monospórico). Ambos hongos fueron cultivados previamente en tubos de medio APD e incubados a 28°C durante ocho días.

Bioensayo de virulencia. La infección se realizó aplicando con micropipeta en la superficie del huevo, 2 μL de la suspensión de 3×10^5 conidios/mL, tanto para *I. fumosorosea* como para *M. anisopliae*. Los huevos infectados se incubaron a 28°C con fotoperíodo 12 x 12 h (luz-obscuridad) colocados individualmente en cajas Petri de plástico con papel filtro estéril. A las 24 h de incubación los huevos infectados se transfirieron a cajas con agar-agua, incubándolos a una temperatura de 28°C durante 10 días.

Testigos. A 25 testigos previamente desinfectados se les aplicó 2 μL del vehículo Tween 80 al 0.5% en la superficie del huevo y se colocaron en cajas Petri con papel filtro a una temperatura de 28°C durante 10 días, para observar su eclosión a ninfa 1.

Observación de huevos infectados. Se observaron los huevos infectados con el microscopio estereoscópico Olympus SZ40. Se tomaron fotos (cámara Olympus SZCTV) para registrar la emergencia de hifas o cambio en la coloración y mortalidad cada 12 h. El criterio tomado para anotar la muerte de cada huevo fue el siguiente: mediante el microscopio estereoscópico pudimos observar la superficie del huevo (zona de infección); si el crecimiento del hongo se presentaba en otra parte del huevo además del opérculo de dicho organismo se consideraba muerto de acuerdo al proceso invasivo natural del hongo. Los resultados obtenidos se anotaron en una tabla de registro con el fin de determinar el TL_{50} de la población (Anexo 2).

Verificación de las características del hongo aislado de huevos infectados. A los 10 días de observación se verificó que el micelio observado en los huevos infectados fuera el característico para cada especie. Se dividió una caja de APD en ocho partes iguales y se tomó con un asa micológica micelio de ocho huevos al azar, se sembró por el método de estría en cada sección y se incubó durante 10 días a 28°C y 60% de HR. En condiciones de esterilidad se tomó micelio de la caja de APD y se depositó en un portaobjetos con azul de algodón y se observó al microscopio compuesto a 40 X para observar los conidios y conidióforos característicos de cada especie utilizada.

Porcentaje de esporulación. Al décimo día de infección para ambos hongos, se anotó en la hoja de registro el número de huevos esporulados y el número de huevos que permanecieron con hifas. Se realizó un promedio para sacar el porcentaje (Ibarra-Aparicio et al., 2005).

Cantidad de conidios por huevo. Al octavo día de infección por ambos hongos, se tomaron cuatro huevos esporulados al azar en cada repetición. Por cada hongo se tomaron 12 huevos en total. El ejemplar muerto se lavó con 2 mL de Tween 80 al 0.5% en tubos Eppendorf y para disgregar los conidios, la solución se agitó durante un minuto (vórtex). Para cuantificar los conidios

se tomaron 15 μ L y se depositaron en la cámara de Neubauer, se contaron los conidios con el microscopio compuesto. El conteo se realizó por duplicado (Lacey y Brooks, 1997).

Análisis estadístico. El bioensayo se analizó con el porcentaje de mortalidad acumulada, y el TL_{50} (Mancebo-Markis, 2009; Throne et al., 1995) se calculó empleando el programa estadístico Polo Plus® Versión 1.0 (2002-2011) LeOra Software (Anexo 4). Se comparó la virulencia de los dos hongos estudiados por medio de la mortalidad acumulada a los tres, seis y nueve 10días de la infección. Los datos de mortalidad fueron previamente transformados a arcoseno con el fin de obtener una distribución normal. La cantidad de conidios por huevo se evaluó por la prueba T de Student con el programa estadístico SPSS Versión 12.0 (1989-2003) LEAD Technologies.

6.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Los huevos de *Meccus pallidipennis* del grupo testigo y de los infectados fueron fijados por inmersión en glutaraldehído al 2.5 % durante 24 h a 4°C y se lavaron en amortiguador de cacodilato de Na 0.2 M (pH 7.2). Posteriormente, fueron seccionados transversalmente cerca del opérculo de manera manual bajo un microscopio estereoscópico. Se realizó una segunda fijación con tetraóxido de osmio al 1% 24 h a 4°C. Las muestras se deshidrataron con etanol en degradación ascendente (70%, 80%, 90%, 95% 100% y tolueno). Se llevaron a cabo 5 infiltraciones en resina-tolueno (1:3, 1:2, 1:1, 2:1,3:1) para finalmente incluir en Araldita 6005, 24 h a 60°C. Se hicieron cortes finos de 60 nm para después contrastar con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-10.

7. RESULTADOS

7.1. REPRODUCCIÓN DEL CICLO BIOLÓGICO DE *Meccus pallidipennis*

Inicio del pie de cría. Se inició con las dos parejas de *Meccus pallidipennis* mencionadas en metodología. Se siguió el ciclo de vida en 80 huevos hasta el estadio de adulto, para conocer los tiempos de desarrollo entre cada estadio del ciclo de vida y el porcentaje de mortalidad para poder llevar un cronograma aproximado de los especímenes a utilizar en los ensayos con insectos.

Ciclo de desarrollo. La tasa de eclosión en huevos fue del 70%, con un promedio de incubación de 18 días (rango 15–23 días). La mortalidad en los cambios de estadio de huevo a ninfa 1, de esta a ninfa 5 y su diferenciación en adulto fue variable (Tabla 5). De los 56 huevos que eclosionaron a ninfa 1, solamente 16 ninfas completaron su desarrollo a adultos (seis hembras y once machos). El promedio de tiempo de desarrollo de huevo a adulto fue de 193.8 días (rango de 137-241; o sea 5.7 a 8.5 meses) (Tabla 5) (Fig. 13).

Tabla 5. Ciclo de desarrollo de huevo a adulto en *Meccus pallidipennis* con condiciones de temperatura y humedad controlada en laboratorio, alimentados cada tercer día en ratones CD-1

Estadio	Eclosión huevos y ecdisis Ninfas	Días		Media ± Desviación Standard
		Mínimo	Máximo	
Ovo - n1	56	15	23	18.446 ± 2.7891
n1 - n2	42	12	27	18.8333 ± 5.25411
n2 - n3	34	15	29	22.7059 ± 5.20215
n3 - n4	29	22	42	32.3103 ± 6.99542
n4 - n5	24	35	55	47.6667 ± 6.90096
n5 - AD	16	38	65	53.8750 ± 11.08076
Total	16	137	241	193.8372 ± 38.2225

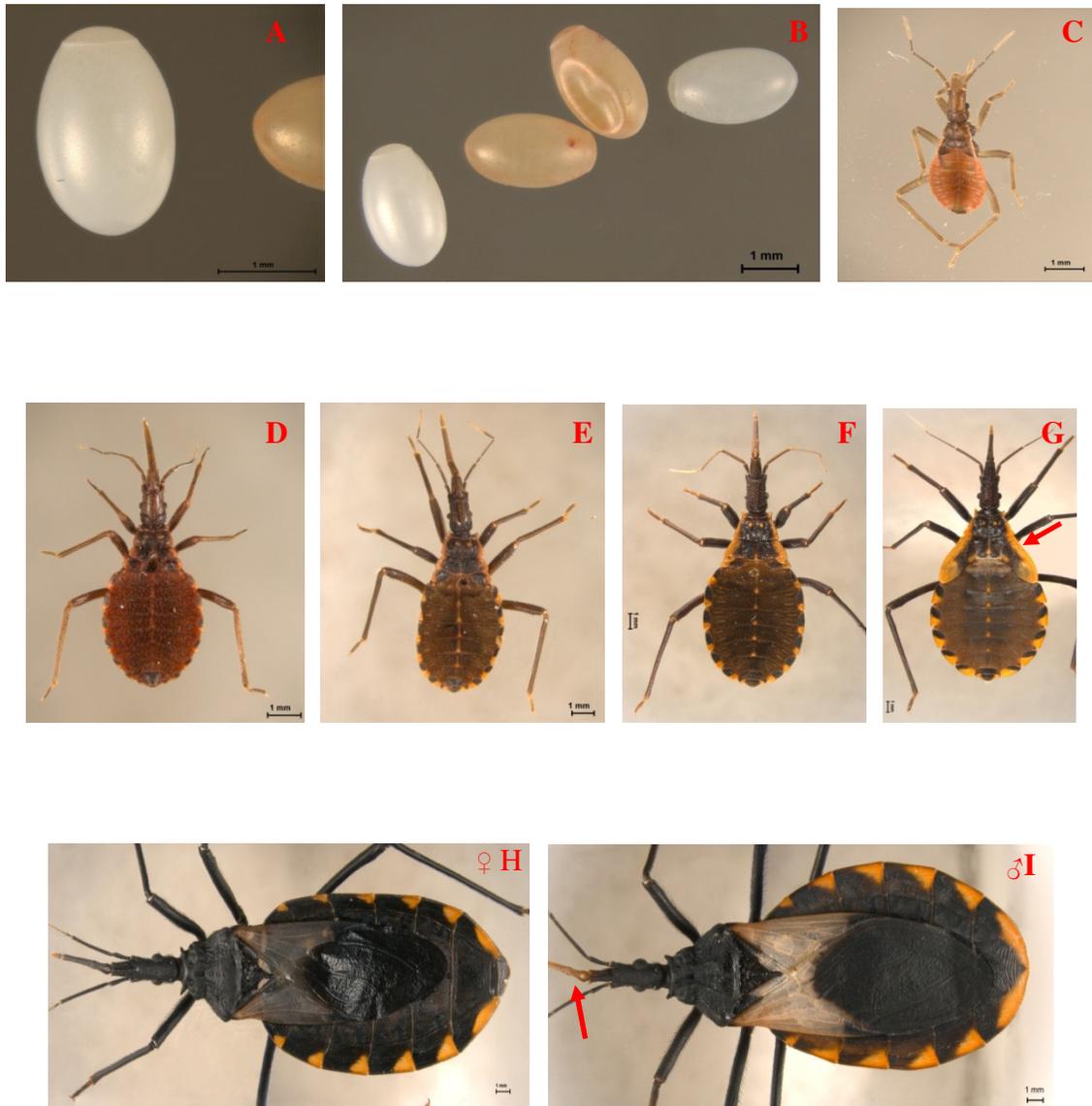


Figura 13. Ciclo de desarrollo de *Meccus pallidipennis*. (A) Huevo viable. (B) Coloración blanquecina de huevos de dos semanas después de haber sido ovipuestos, coloración marrón o naranja de huevos a punto de eclosionar. (C) Ninfa uno (3 mm), vista dorsal. (D) Ninfa dos (7 mm). (E) Ninfa tres (11 mm). (F) Ninfa cuatro (15 mm). (G) Ninfa cinco (23 mm) y primordios alares (flecha). (H) Adulto hembra 3.2-3.5cm, aparato ovipositor (flecha). (I) Adulto macho 3.1-3.4 cm.

Oviposición. Durante 15 oviposiciones se observó el número mínimo y máximo de huevos puestos por las dos hembras, para obtener el promedio de huevos y así asegurar el número de ejemplares necesarios para los bioensayos de virulencia. El promedio de huevos ovipuestos por la primer hembra fue de 11.8 huevos (rango de 3-32) semanalmente, y en la segunda fue de 16.7 huevos (rango de 3-28) (Tabla 6).

Tabla 6. Promedio de huevos ovipuestos por hembras de *Meccus pallidipennis*

	Mínimo	Máximo	Media ± Desviación Standard
Primer hembra	3	32	11.8667 ± 9.17190
Segunda hembra	3	28	16.7333 ± 8.18070

7.2. AISLADOS FÚNGICOS (HONGOS ENTOMOPATÓGENOS)

Características de los aislados fúngicos. En la figura 14 A y B se puede observar el aspecto macroscópico y microscópico de *I. fumosorosea* cepa EH-511/3. En medio APD se observó a los 15 días una colonia de aspecto algodonoso de color blanco, cuando se encontró más esporulada se observaron cambios de tonalidades hacia el gris y rosáceo (Fig. 14 A). Al microscopio compuesto se observaron conidióforos bien desarrollados, simples, verticilados con fiálides, con una porción basal globosa, y de estas saliendo conidios en cadena de cilíndricos a fusiformes, con un rango de tamaño entre 3-4 x 1-2 μm (Fig. 14 B).

En la figura 14 C y D se puede observar el aspecto macroscópico y microscópico de *M. anisopliae* cepa EH-473/4. En medio APD se observó a los 15 días una colonia verde, cuando se encontró más esporulada la colonia se observó verde oscuro (Fig. 14 C). Al microscopio compuesto se observaron conidióforos simples o ramificados y de éstos saliendo conidios basípetos catenulados y cilíndricos, con un rango de tamaño entre 6.3 - 9.8 x 2.1 - 2.5 μm (Fig. 14 D).



Figura 14. Colonias y microscopía de los aislados fúngicos en medio de APD. (A) *Isaria fumosorosea* cepa EH-511/3. (B) Conidióforos y conidios de *I. fumosorosea* con azul de algodón, 400 X. (C) *Metarhizium anisopliae* cepa EH-473/4. (D) Conidios catenulados de *M. anisopliae* con azul de algodón, 400 X.

Suspensión conidial. Se trabajó con cinco concentraciones diferentes 1×10^7 , 3×10^6 , 1×10^6 , 3×10^5 y 1×10^5 conidios/mL de *Isaria fumosorosea* (EH-511/3) para el bioensayo de CL_{50} y con una concentración de 3×10^5 conidios/mL de la misma especie y de *Metarhizium anisopliae* (EH-473/4) para el TL_{50} . Todas las suspensiones anteriores formuladas con Tween® 80 al 0.5 %.

Viabilidad de conidios en el bioensayo de CL_{50} . La viabilidad de los conidios utilizados de *Isaria fumosorosea* (EH-511/3) fue del $93.20\% \pm 1.16762$.

Viabilidad de conidios en el bioensayo de TL_{50} . La viabilidad de los conidios utilizados de *Isaria fumosorosea* (EH-511/3) fue del $93.83\% \pm 3.32916$, y para los conidios utilizados de *Metarhizium anisopliae* (EH-473/4) fue de $93.66\% \pm 2.51661$.

7.3. BIOENSAYOS DE VIRULENCIA: CL₅₀ Y TL₅₀

7.3.1. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀)

Para obtener la concentración letal media (CL₅₀), se utilizaron cinco diferentes concentraciones de conidios del hongo *Isaria fumosorosea* (EH-511/3) y 36 huevos de *Meccus pallidipennis* por cada concentración (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración de conidios y ejemplares utilizados para la obtención de la CL₅₀ en el estadio de huevos de *Meccus pallidipennis*

CONCENTRACIÓN DE CONIDIOS	2 µL DE SUSPENSIÓN: CONIDIOS POR HUEVO	EJEMPLARES POR CADA BIOENSAYO	NÚMERO DE REPETICIONES	TOTAL DE EJEMPLARES
1 x 10 ⁷	20,000	12	3	36
3 x 10 ⁶	6000	12	3	36
1 x 10 ⁶	2000	12	3	36
3 x 10 ⁵	600	12	3	36
1 x 10 ⁵	200	12	3	36

Los resultados de la mortalidad acumulada obtenidos para cada dosis, durante las tres repeticiones, son necesarios para calcular la concentración letal media y se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de mortalidad acumulada obtenida con cinco diferentes concentraciones de conidios en huevos de *Meccus pallidipennis*

CONCENTRACIÓN DE CONIDIOS	CONIDIOS POR HUEVO	MORTALIDAD 10 días	% MORTALIDAD TOTAL
1×10^7	20,000	36	100%
3×10^6	6000	36	100%
1×10^6	2000	35	97%
3×10^5	600	28	78%
1×10^5	200	17	47%

El 100% de mortalidad se alcanzó con las concentraciones de 20,000 y 6000 conidios a las 108 h (4.5 días) y 132 h (5.5 días) después de la infección, respectivamente.

Testigos. Se utilizaron 36 testigos en total (12 testigos por cada bioensayo), se les aplicó 2 μ L de vehículo Tween 80 al 0.5%, de los cuales el 86% (31/36) eclosionaron a ninfas 1 (Fig. 15).



Figura 15. Porcentaje de eclosión en 36 huevos testigos de *M. pallidipennis*.

Tabla 9. CL₅₀ del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea*

Especie	Cepa	CL ₅₀	Límite inferior	Límite superior	Heterogeneidad	X ²
<i>Isaria fumosorosea</i>	EH-511/3	2.263 x 10 ² (226.349 conidios por huevo)	127.970	320.764	0.629	8.179

Intervalo de confianza al 95%.

De acuerdo a los resultados de la CL₅₀ se escogió la concentración de 3 X 10⁵ conidios/mL (6000 conidios en 2 µL aplicados a cada huevo) para llevar a cabo el tiempo letal medio TL₅₀ (Tabla 8), ya que con esta concentración se observó bien el fenómeno de virulencia en el estadio de huevos de *Meccus pallidipennis*.

Fue necesario llevar a cabo la CL₅₀ para establecer una concentración que nos permitiera observar bien el fenómeno de virulencia, ya que en experimentos preliminares en el laboratorio se probaron diferentes dosis (entre ellas de 1 x 10⁷: 20,000 conidios en 2 µL), pero se obtuvieron pocos datos para el cálculo del TL₅₀, y las concentraciones utilizadas producían muy rápidamente el 100% de mortalidad en los huevos. Teniendo el resultado de la CL₅₀ se pudo obtener una concentración efectiva para utilizarla en el TL₅₀ en ambos hongos entomopatógenos.

7.3.2. TIEMPO LETAL MEDIO (TL₅₀)

Isaria fumosorosea (EH-511/3)

Bioensayo de virulencia. Se observó cada 12 h la emergencia de micelio y mortalidad en 75 huevos (25 por cada una de tres repeticiones) de *Meccus pallidipennis* infectados con *I. fumosorosea* (EH-511/3). El primer huevo infectado se observó a las 36 h (Tabla 10).

Tabla 10. Mortalidad acumulada en 75 huevos de *M. pallidipennis* infectados con *Isaria fumosorosea* (EH-511/3)

DÍAS POSTERIORES A LA INFECCIÓN	n = 75 huevos		
	HORAS POSTERIORES A LA INFECCIÓN	MORTALIDAD TOTAL	% DE MORTALIDAD
1	12	0	0
	24	0	0
2	36	1	1
	48	7	9
3	60	41	55
	72	48	64
4	84	61	81
	96	64	85
5	108	68	91
	120	68	91
6	132	68	91
	144	68	91
7	156	69	92
	168	69	92
8	180	69	92
	1982	69	92
9	204	69	92
	216	69	92
10	228	69	92
	240	69	92

Los bioensayos se realizaron con el fin de poder observar la virulencia de *I. fumosorosea* en huevos de *Meccus pallidipennis*. A los tres días se observó una mortalidad acumulada del 64% y al quinto día ya se había obtenido una mortalidad acumulada del 91%. Esta cepa de *I. fumosorosea* fue capaz de matar al $92\% \pm 8.0$ de los insectos prueba a una concentración de 3×10^5 (Fig. 17). El resultado de la prueba de TL_{50} fue de 66.685 h (2.77 días) (Tabla 12). Los datos obtenidos con la CL_{50} y TL_{50} sugieren una elevada virulencia del hongo hacia los huevos de *M. pallidipennis*.

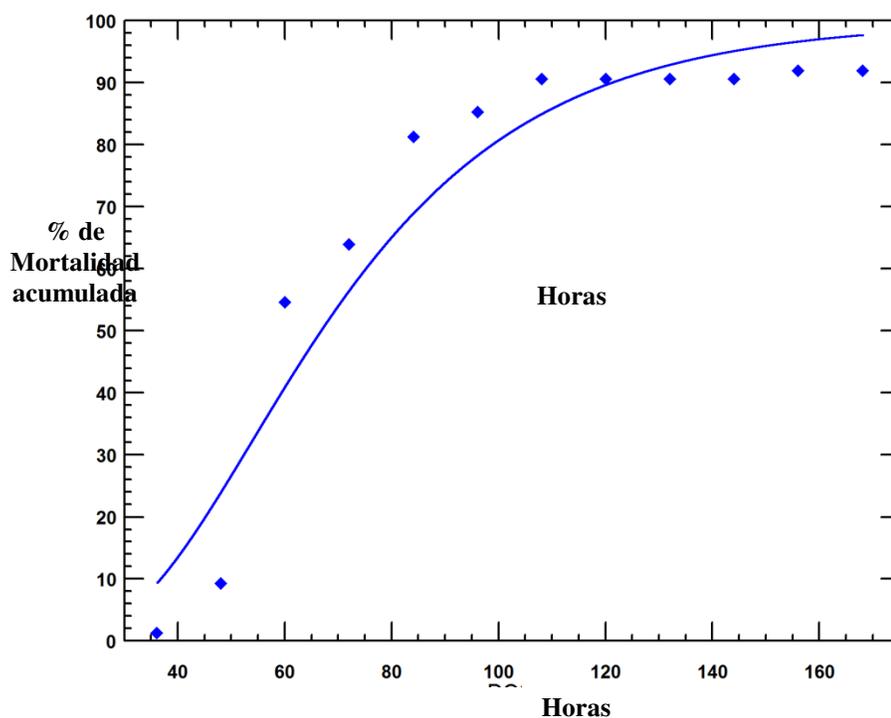


Figura 17. Mortalidad acumulada del estadio de huevo de *Meccus pallidipennis* infectados con conidios de *I. fumosorosea*.

Tabla 11. Valores del TL_{50} para *I. fumosorosea* en huevos de *Meccus pallidipennis*

Especie	Cepa	TL_{50}	Límite inferior	Límite superior	Heterogeneidad	χ^2
<i>Isaria</i>						

<i>fumosorosea</i>	EH-511/3	66.685 h (2.77 días)	56.205	75.708	5.0182	50.182
--------------------	----------	----------------------	--------	--------	--------	--------

Intervalo de confianza al 95%

Testigos. A los 25 testigos utilizados se les aplicó 2 μ L del vehículo Tween 80 al 0.5%, de los cuales el 76% (19/25) eclosionaron a ninfas 1 durante los 10 días de observación (Fig. 18).



Figura 18. Porcentaje de eclosión en 25 huevos testigos de *M. pallidipennis*

Observación de huevos infectados. A las 36 h posteriores a la infección, se observó la presencia de hifas de *I. fumosorosea* en la zona del opérculo y alrededor del huevo, sin embargo, fue más fácil fotografiar las hifas a partir de las 48 h (Fig. 19).

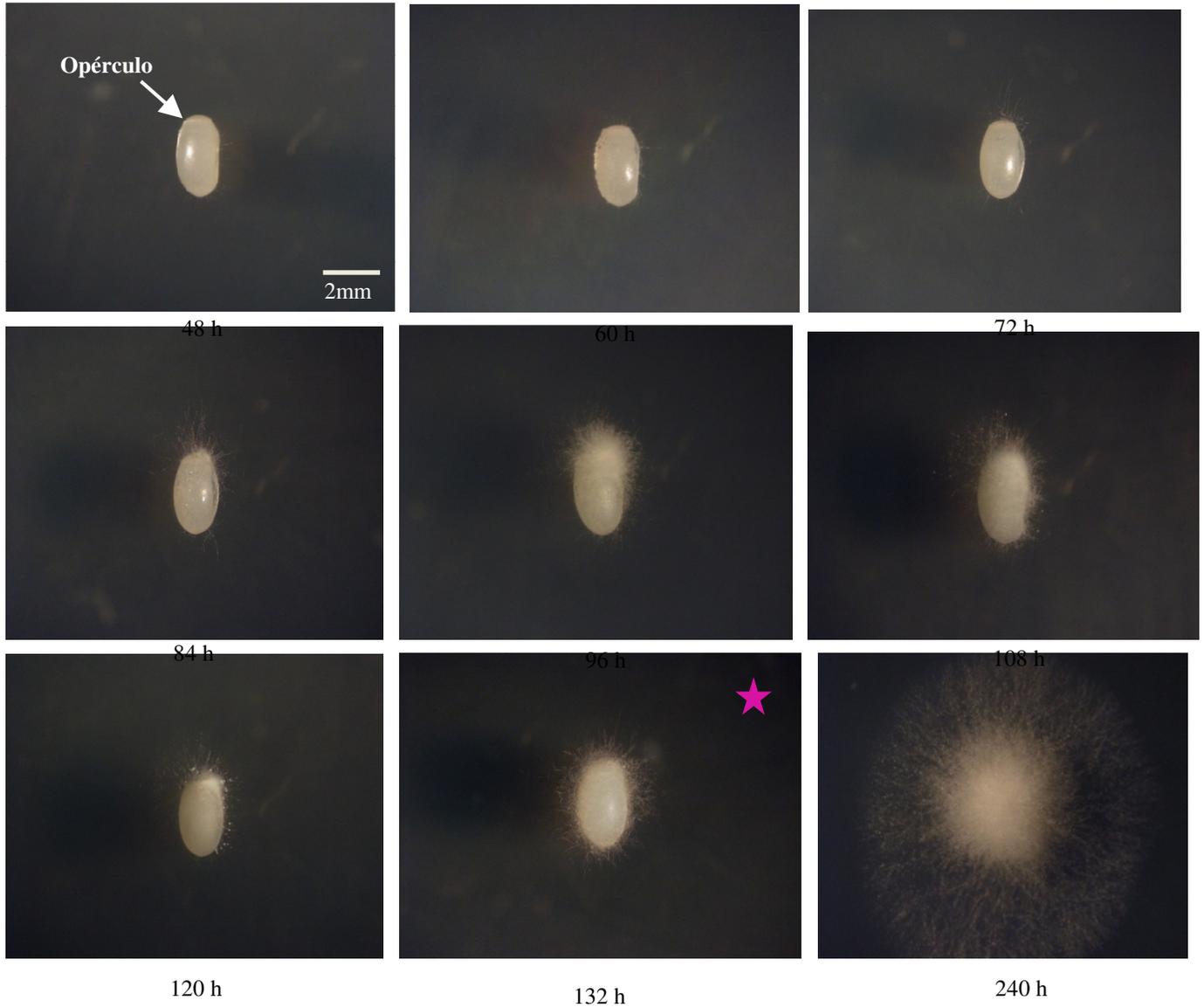


Figura 19. Huevos infectados con conidios de *I. fumosorosea* (EH-511/3). Se observan hifas emergiendo del opérculo (48 h) hasta cubrir totalmente el huevo a las 240 h. La estrella indica el tiempo en el cual se realizó la microscopía electrónica de transmisión.

Algunos de los signos de la micosis en huevos de *M. pallidipennis* infectados con *I. fumosorosea* fueron perceptibles a partir del día cinco, como lo fue la modificación en el color del corio. Normalmente el huevo presenta una coloración blanquecina opaca (Fig. 20 A), que en algunos huevos después de la infección cambió a transparente (Fig. 20 B-C).



Figura 20. Signos de la micosis en huevos de *M. pallidipennis* infectados con *I. fumosorosea*. Corio transparente a los cinco (A) y diez días posteriores a la infección (B).

Verificación de las características del hongo aislado de los huevos infectados. Las muestras de micelio tomadas al décimo día de infección de los huevos, se sembraron en medio de APD y se observó a los 15 días una colonia de aspecto algodonoso de color blanco, cuando estaba bien esporulada se observaron cambios de tonalidades hacia el gris-rosáceo (Fig. 21 A), que corresponde a las características coloniales del hongo *I. fumosorosea* descritas anteriormente. La muestra tomada de la colonia se observó al microscopio compuesto y se observaron conidióforos bien desarrollados, simples, verticilados y fiálides con una porción basal globosa, de los cuales salían conidios fusiformes que corresponden a la imagen típica del hongo utilizado (Fig. 21 B).

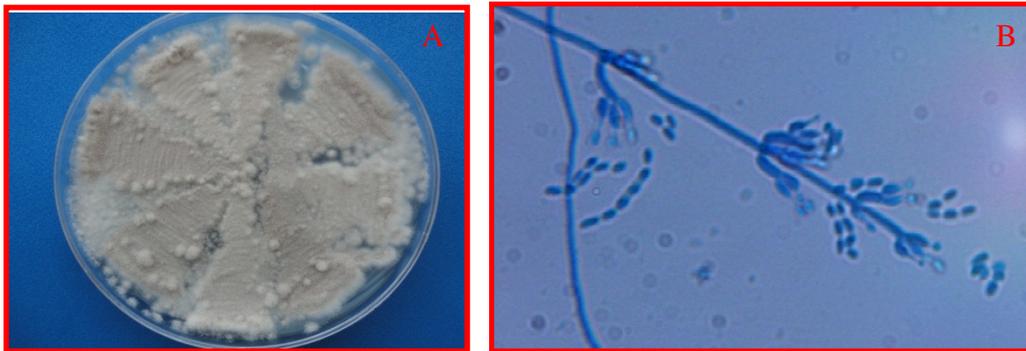


Figura 21. Características de *I. fumosorosea* (EH-511/3) aislado de los huevos infectados. Colonia en medio de APD (A) y conidióforos y conidios típicos del hongo, 400 X (B).

Porcentaje de esporulación. De 69 huevos infectados durante el bioensayo solamente se observó esporulación en 60 (87%) de ellos; en el resto sólo se observaron hifas hasta finalizar el bioensayo (Fig. 22 y 23).

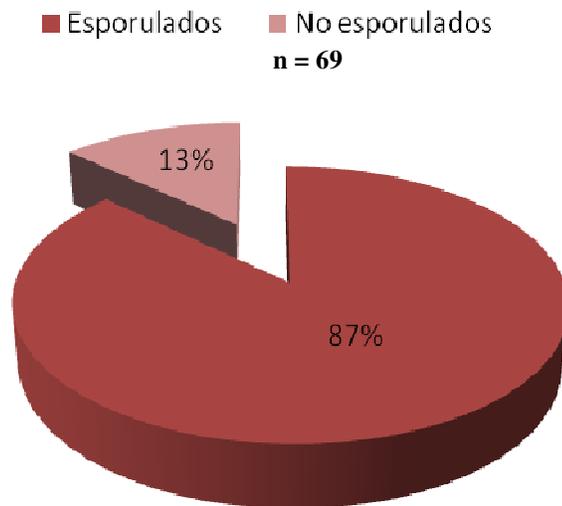


Figura 22. Porcentaje de esporulación en 69 huevos de *M. pallidipennis* infectados con conidios de *I. fumosorosea*.

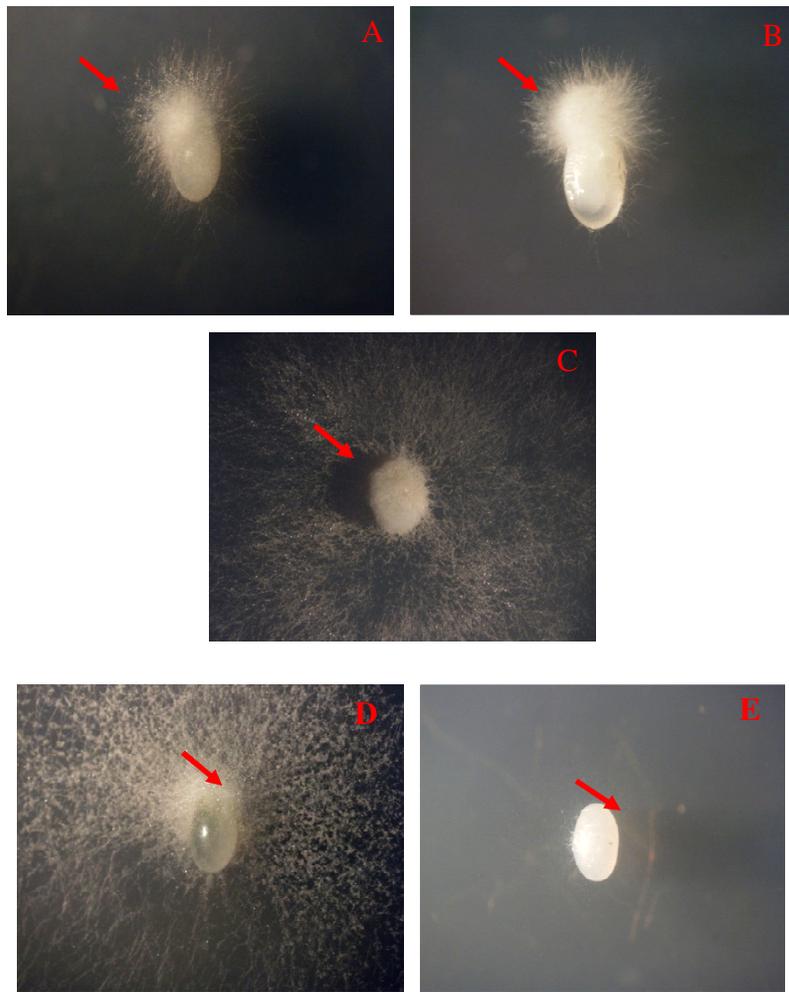


Figura 23. Huevos de 10 días posteriores a la infección. (A-D) Esporulación de *Isaria fumosorosea*, se observa micelio saliendo del opérculo (flecha). (E) Huevo sin esporular, se observan únicamente hifas somáticas (flecha).

Cantidad de conidios por huevo infectado. De 60 huevos infectados que presentaban esporulación, se tomaron cuatro al azar en cada repetición. En estos 12 huevos esporulados se cuantificó la cantidad de conidios, obteniéndose desde 6×10^7 hasta 1.5×10^8 (Tabla 12). El promedio de conidios encontrado fue de $8.9 \times 10^7 \pm 2.9 \times 10^7$.

Tabla 12. Conidios de *I. fumosorosea* en huevos esporulados de *M. pallidipennis*

Huevo	Conidios por mL de cada huevo
1	9.7×10^7
2	6.0×10^7
3	1.1×10^8
4	8.0×10^7
5	6.0×10^7
6	1.5×10^8
7	8.5×10^7
8	1.4×10^8
9	7.7×10^7
10	7.7×10^7
11	6.0×10^7
12	7.7×10^7
Media \pm Desviación standard	$8.9 \times 10^7 \pm 2.9 \times 10^7$

***Metarhizium anisopliae* (EH-473/4)**

Bioensayo de virulencia. Se observó cada 12 h la emergencia de micelio y mortalidad en 75 huevos (25 por cada una de tres repeticiones) de *M. pallidipennis* infectados con *M. anisopliae*. La primera emergencia de micelio de los huevos infectados se observó a las 60 h después de la infección (Tabla 13).

Tabla 13. Mortalidad acumulada en 75 huevos de *M. pallidipennis* infectados con *Metarhizium anisopliae* (EH-473/4)

DÍAS POSTERIORES A LA INFECCIÓN	HORAS POSTERIORES A LA INFECCIÓN	n = 75 huevos	
		MORTALIDAD ACUMULADA	% DE MORTALIDAD
1	12	0	0
	24	0	0
2	36	0	0
	48	0	0
3	60	26	34
	72	39	52
4	84	56	75
	96	60	80
5	108	64	85
	120	65	87
6	132	66	88
	144	66	88
7	156	66	88
	168	66	88
8	180	66	88
	192	66	88
9	204	66	88
	216	66	88
10	228	66	88
	240	66	88

El bioensayo de virulencia de *Metarhizium anisopliae* en huevos de *M. pallidipennis* se observó durante 10 días. A los tres días se observó una mortalidad acumulada del 52%, y al quinto día ya se había obtenido una mortalidad acumulada del 87%. Esta cepa de *M. anisopliae* es capaz de matar al $88\% \pm 4.0$ de los insectos prueba a una concentración de 3×10^5 (Fig. 24). El resultado de la prueba de TL_{50} fue de 76.320 h (3.18 días) (Tabla 14).

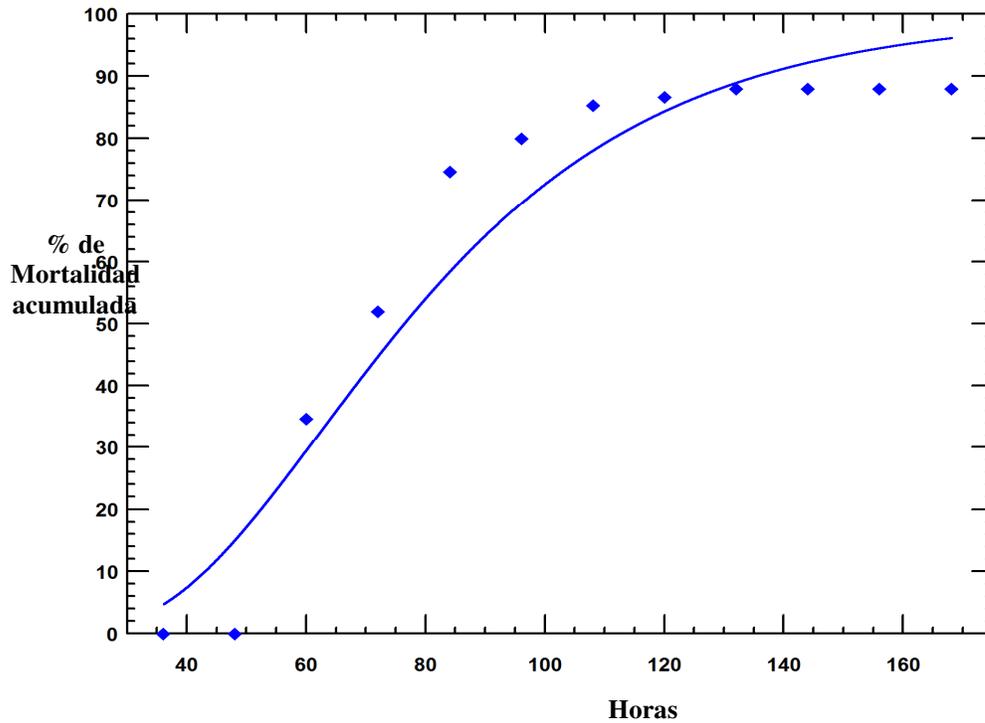


Figura 24. Mortalidad acumulada del estadio de huevo de *Meccus pallidipennis* infectados con conidios de *M. anisopliae*.

Tabla 14. Valores del TL_{50} para *M. anisopliae* en huevos de *Meccus pallidipennis*

Especie	Cepa	TL_{50}	Límite inferior	Límite superior	Heterogeneidad	χ^2
<i>Metarhizium anisopliae</i>	EH-473/4	76.320 h (3.18 días)	65.285	84.290	5.4859	54.859

Intervalo de confianza al 95%

Testigos. A los 25 testigos utilizados se les aplicó 2 μ L del vehículo Tween 80 al 0.5 %, de los cuales el 72 % (18/25) eclosionaron a ninfas n1 durante los 10 días de observación (Fig. 25).

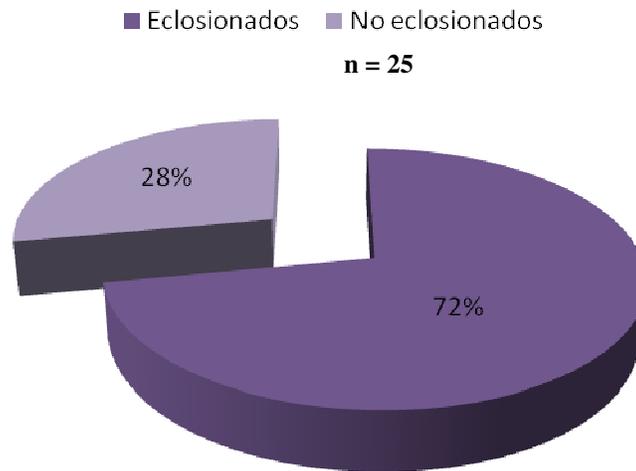


Figura 25. Porcentaje de eclosión en 25 huevos testigos de *M. pallidipennis* infectados con *M. anisopliae*.

Observación de huevos infectados. A las 60 h posteriores a la infección, se observó la presencia de hifas de *M. anisopliae* únicamente en la zona del opérculo, y a partir de las 72 h alrededor del huevo. A las 156 h se observó la presencia de micelio con algunos conidios de color verde característico del hongo en un extremo del opérculo; tanto el micelio como la esporulación del hongo fueron aumentando paulatinamente hasta cubrir todo el huevo a las 240 h (Fig. 26).

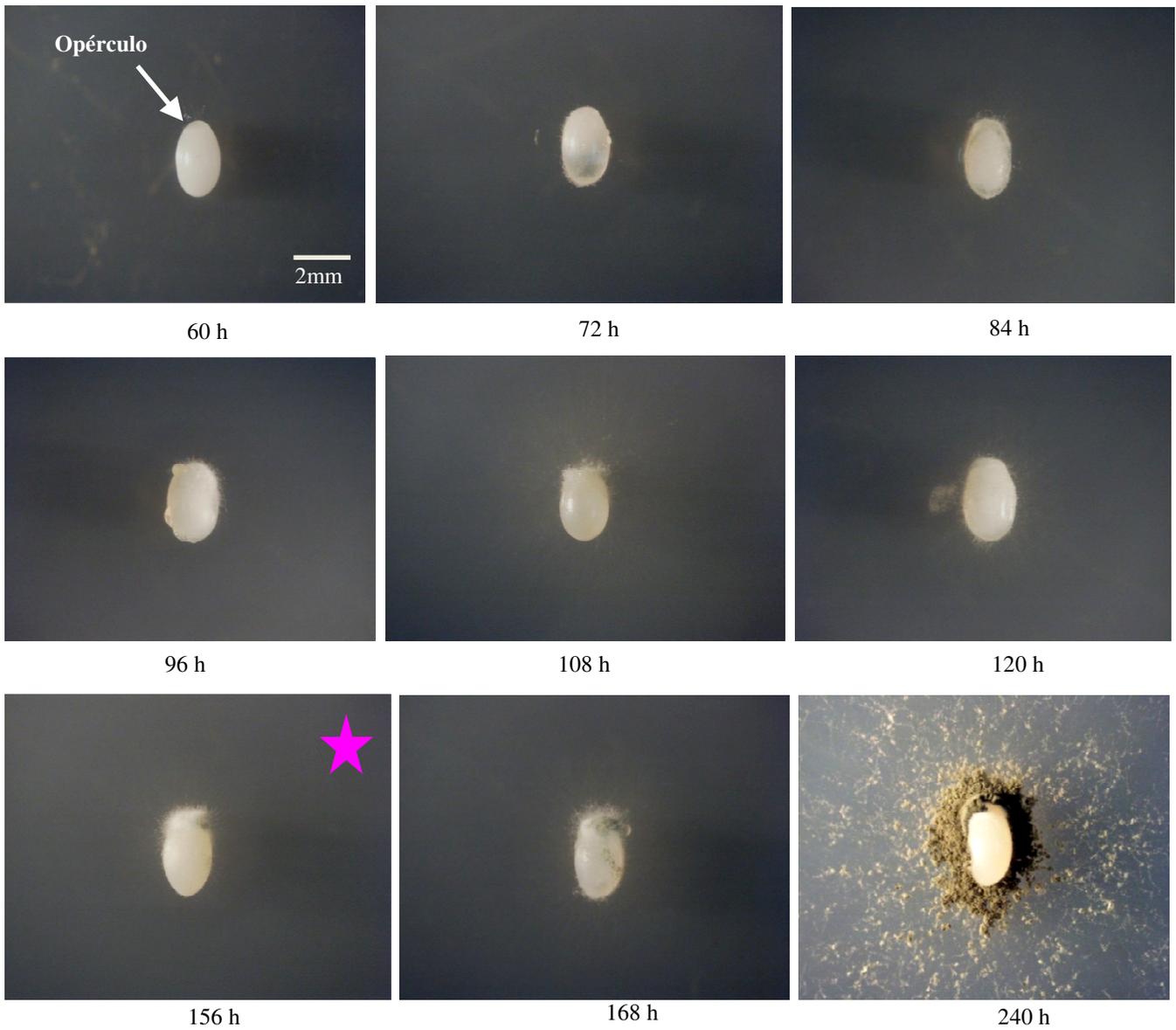


Figura 26. Huevos de una a tres semanas de haber sido ovipuestos, infectados con conidios de *M. anisopliae* (EH-473/4). Se observan hifas emergiendo del opérculo (60 h) hasta cubrir totalmente el huevo a las 240 h. La estrella indica el tiempo en el cual se realizó la microscopía electrónica de transmisión.

Algunos de los signos de la micosis en huevos de *M. pallidipennis* infectados con *M. anisopliae* fueron perceptibles a partir del día cinco, como lo fue la modificación en el color del corio. Normalmente el huevo presenta una coloración blanquecina opaca (Fig. 27 A), que en algunos huevos después de la infección cambió a verde-café oscuro (Fig. 27 B-D).



Figura 27. Signos de la micosis en huevos de *M. pallidipennis* infectados con *M. anisopliae*. Corio café a los seis (B y C) y diez días posteriores a la infección (D).

Verificación de las características del hongo aislado de los huevos infectados. Las muestras de micelio tomadas al décimo día de infección de los huevos, que se sembraron en APD, mostraron una colonia característica de *Metarhizium anisopliae*, primero una colonia de micelio blanco algodonosa que con el tiempo esporuló y produjo un color verde oscuro a los 15 días de incubación a 28°C (Fig. 28 A). La muestra tomada de la colonia se observó al microscopio compuesto y se observaron los conidióforos simples o ramificados con conidios basípetos catenulados, cilíndricos que corresponden a la imagen típica del hongo utilizado (Fig. 28 B).

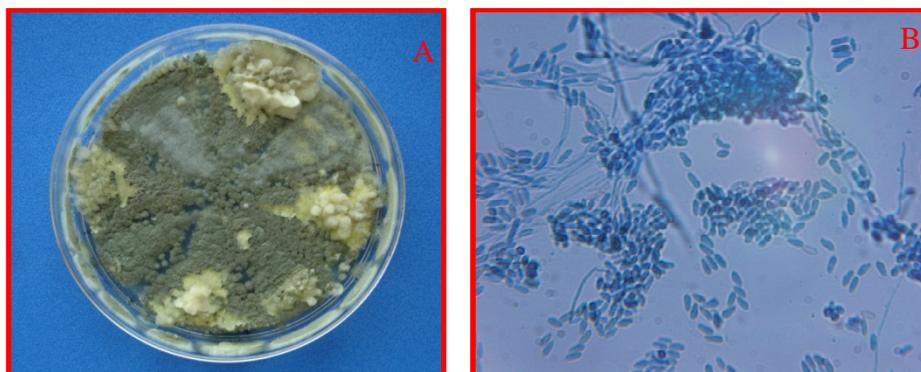


Figura 28. Características de *M. anisopliae* (EH-473/4) aislado de los huevos infectados. Colonia en medio de APD (A) y conidios cilíndricos típicos del hongo, 400 X (B).

Porcentaje de esporulación. De 66 huevos infectados durante el bioensayo solamente se observó esporulación en 55 (83%) de ellos; en el resto sólo se observaron hifas somáticas hasta finalizar el bioensayo (Fig. 29 y 30).



Figura 29. Porcentaje de esporulación en 66 huevos de *M. pallidipennis* infectados con conidios de *M. anisopliae*.

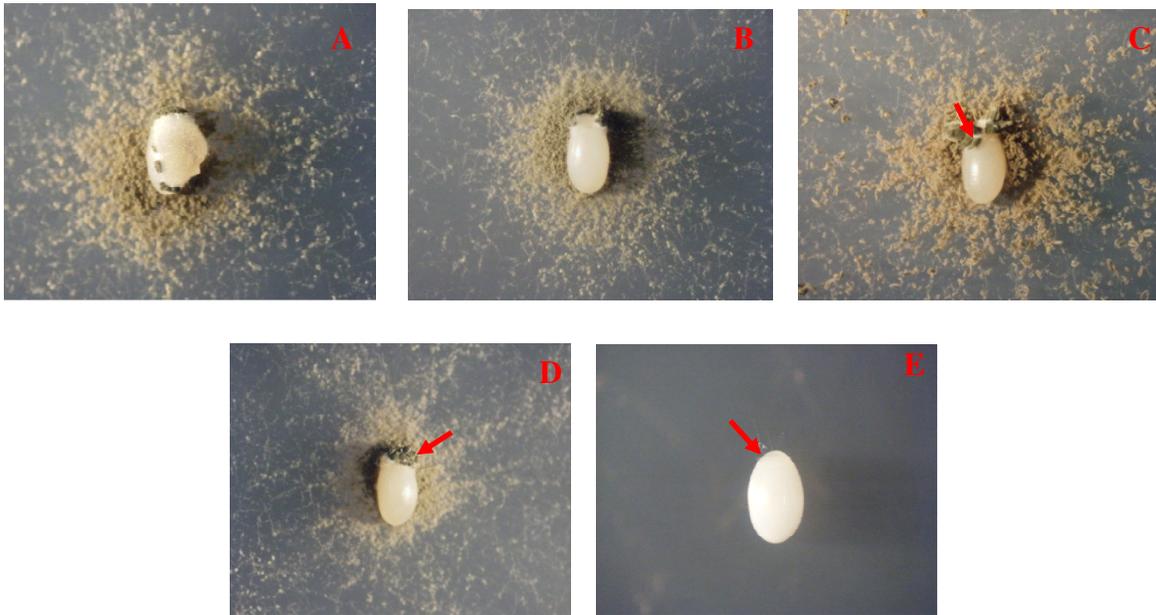


Figura 30. Huevos de 10 días posteriores a la infección. (A-D) Esporulación de *Metarhizium anisopliae*, se observan agregados de conidios en columna típicos de la especie (C-D) (flecha). (E) Huevo sin esporular, se observan únicamente hifas somáticas (flecha).

Cantidad de conidios por huevo infectado. De 55 huevos infectados que presentaban esporulación, se tomaron cuatro al azar en cada repetición. En estos 12 huevos esporulados se cuantificó la cantidad de conidios, obteniéndose desde 3.5×10^7 hasta 8.5×10^8 por mL (Tabla 15). El promedio de conidios encontrado fue de $6.0 \times 10^7 \pm 1.6 \times 10^7$.

Tabla 15. Conidios de *M. anisopliae* en huevos esporulados de *M. pallidipennis*

Huevo	Conidios por mL de cada huevo
1	6.7×10^7
2	7.7×10^7
3	5.2×10^7
4	6.0×10^7
5	4.0×10^7
6	4.2×10^7
7	6.7×10^7
8	3.5×10^7
9	5.0×10^7
10	8.0×10^7
11	8.5×10^7
12	7.0×10^7
Media \pm Desviación standard	$6.0 \times 10^7 \pm 1.6 \times 10^7$

Comparación de la virulencia entre *I. fumosorosea* y *M. anisopliae*. Al comparar la virulencia de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae*, en relación a la mortalidad acumulada a los tres (F = 8.0; t = 1.162; g.l. = 4; P = 0.310), seis y nueve días (F = 0.800; t = 0.775; g.l. = 4; P = 0.482) no se observaron diferencias significativas (prueba de T para muestras independientes) entre ellos. Esta prueba indica que ambos hongos utilizados se comportaron de manera similar en la infección de huevos de *M. pallidipennis*.

Al comparar la cantidad de conidios por huevo, producidos durante la infección de *M. pallidipennis* con *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* se observaron diferencias significativas (F = 2.785; t = 2.934; g.l. = 22; P = 0.008), lo que nos indica que la mayor producción de conidios durante los bioensayos se observó con el hongo *I. fumosorosea*.

6.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)

Huevos de *M. pallidipennis* infectados con *Isaria fumosorosea* (EH-511/3)

Este método se realizó en los huevos de seis días posteriores a la infección, para comprobar que el hongo había penetrado y destruido al embrión. En la figura 31 se puede observar un corte semifino transversal del huevo testigo con el embrión completo. En la figura 32 A se puede observar tejido embrionario con células uniformes que conservan su forma y núcleo. A los seis días posteriores a la infección se observaron diversas estructuras fúngicas y hemocitos dañados del embrión (Figs. 32 B-F). En la figura 32 B se muestra un conidio con vesículas citoplásmicas heterogéneas y la pared celular bien delimitada, al lado de hemocitos degradados y sin núcleo; en la figura 32 C se muestran varios cuerpos hifales rodeados de un material que sugiere hemolinfa coagulada y sin hemocitos a la vista; en la figura 32 D se muestra un cuerpo hifal con septo y conidios que en su pared celular se puede observar una capa interna translúcida y capa externa electrodensa, todas estas estructuras fúngicas rodeadas con el mismo material descrito en la foto anterior 32C. En la figura 32 E se observan varios conidios en el espacio vitelino, rodeados también del material que sugiere hemolinfa coagulada, y en el tejido embrionario degradado del endocorio se muestran hemocitos con su núcleo y citoplasma degradados. Por último, en la figura 32 F, se muestra un fragmento de cuerpo hifal con vesículas citoplásmicas heterogéneas, algunas con material flocular, rodeado del mismo material de hemolinfa coagulada observado alrededor de las demás estructuras fúngicas en las fotos anteriores. Entre la capa externa electrodensa de la pared celular del hongo y el material que sugiere hemolinfa coagulada, se nota un espacio electrotranslúcido alrededor de la hifa.

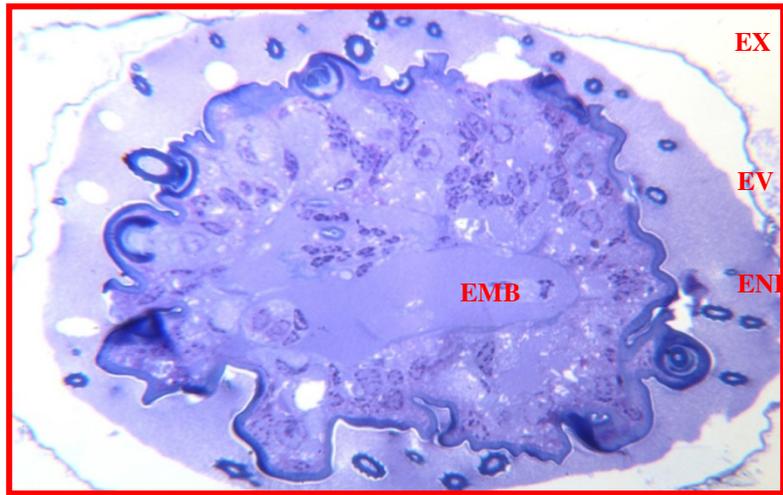


Figura 31. Corte semifino transversal de huevo testigo de *M. pallidipennis* de 15 días. Se observa el exocorión del huevo (EX), el espacio vitelino (EV), endocorio (END) y el embrión (EMB), 1250X.

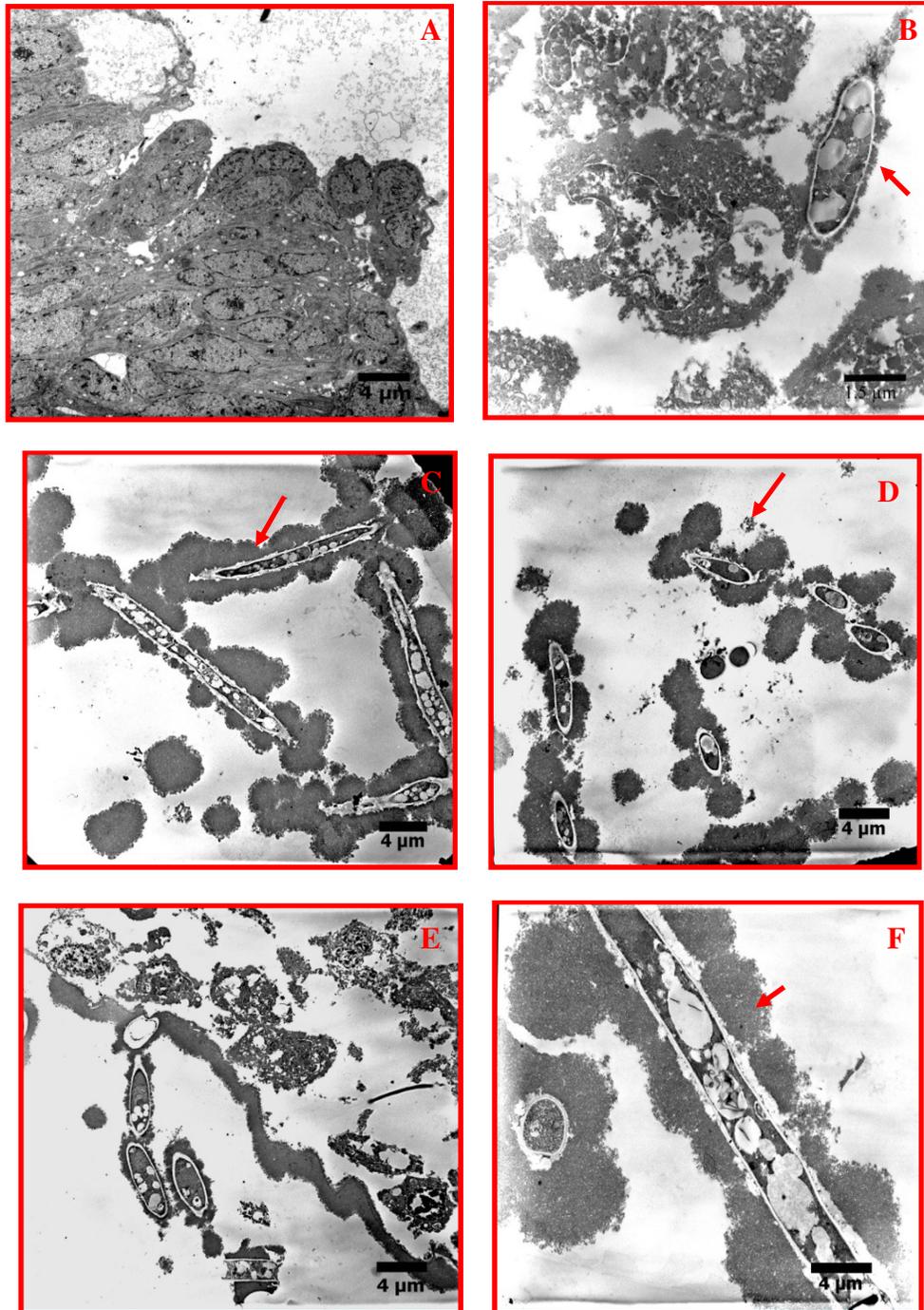


Figura 32. Microscopía electrónica de transmisión en huevos de *Meccus pallidipennis* a las 144 h (6 días) después de haber sido infectados con *Isaria fumosorosea* (EH-511-/3). (A) Tejido embrionario con células que conservan su forma y núcleo. (B) Conidios con presencia de vesículas citoplásmicas heterogéneas (flecha), se observa la presencia de la pared celular del hongo (capa interna, capa externa y un espacio translúcido) cerca de hemocitos dañados. (C) Cuerpos hifales fúngicos rodeados de material que sugiere hemolinfa coagulada (flecha). (D) Cuerpos hifales y conidios rodeados del mismo material que en C (flecha). (E) Hemocitos dañados con núcleo y citoplasma degradado y conidios al costado de la pared del embrión. (F) Segmento de cuerpo hifal rodeado con el material que sugiere hemolinfa coagulada, con espacio translúcido entre ellos (flecha).

Huevos de *M. pallidipennis* infectados con *Metarhizium anisopliae* (EH-473/4)

Para comprobar la infección del huevo por *M. anisopliae* se realizó la MET en huevos de siete días post-infección. En la figura 33 se muestra un corte semifino transversal de un huevo testigo sin infección, para observar las estructuras normales: exocorio (EX), espacio vitelino (EV), endocorio (END) y embrión (EMB). En la figura 34 A se puede observar el tejido embrionario del testigo, uniforme, con las células íntegras conservando su forma y núcleo. En las figuras 34 B-F se muestran diferentes propágulos fúngicos en el huevo infectado a las 156 h. En la figura 34 B y C se muestran conidios con pared celular externa (electrodensa) y pared celular interna (electrotranslúcida) con vesículas citoplásmicas heterogéneas, sobresale una vesícula con material granular floculoso, alrededor del conidio se observa material que sugiere hemolinfa coagulada y hemocitos con núcleo y citoplasma destruido (también observado con el hongo *I. fumosorosea*); en la figura 34 D se muestran tres conidios del hongo, dos de ellos en aparente gemación y algunas de sus vesículas interiores con un aspecto flocular. El tercer conidio, menor en tamaño, muestra microfibrillas electrodensas (flecha) en la parte más externa de la pared celular del hongo que sugiere pigmento. En la figura 34 E se muestra un cuerpo hifal con septo y cuerpos de Woronin (poros septales), además de vesículas citoplásmicas heterogéneas rodeado por el mismo material que semeja hemolinfa coagulada de las fotos anteriores. En la figura 34 F se muestran estructuras fúngicas dentro y fuera de la membrana vitelina (flecha), la membrana pareciera estar degradada y los conidios del hongo se observan rodeados de material que sugiere hemolinfa coagulada, semejante a las fotos ya descritas, incrustado con hemocitos degradados del embrión (flechas) en el endocorio; en el espacio vitelino se muestra un conidio germinando con un segmento de la pared celular del tubo germinativo en unión con el material que sugiere hemolinfa coagulada.

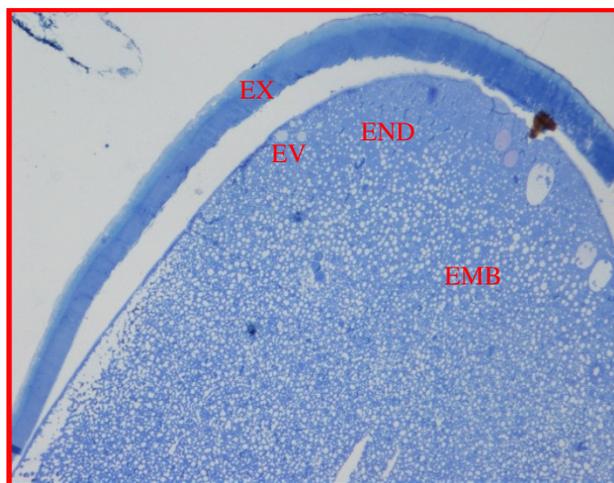


Figura 33. Corte semifino transversal de huevo de *M. pallidipennis* de 15 días sin infección. Se observa el exocorio del huevo (EX), el espacio vitelino (EV), endocorio (END) y el embrión (EMB), 1250 X.

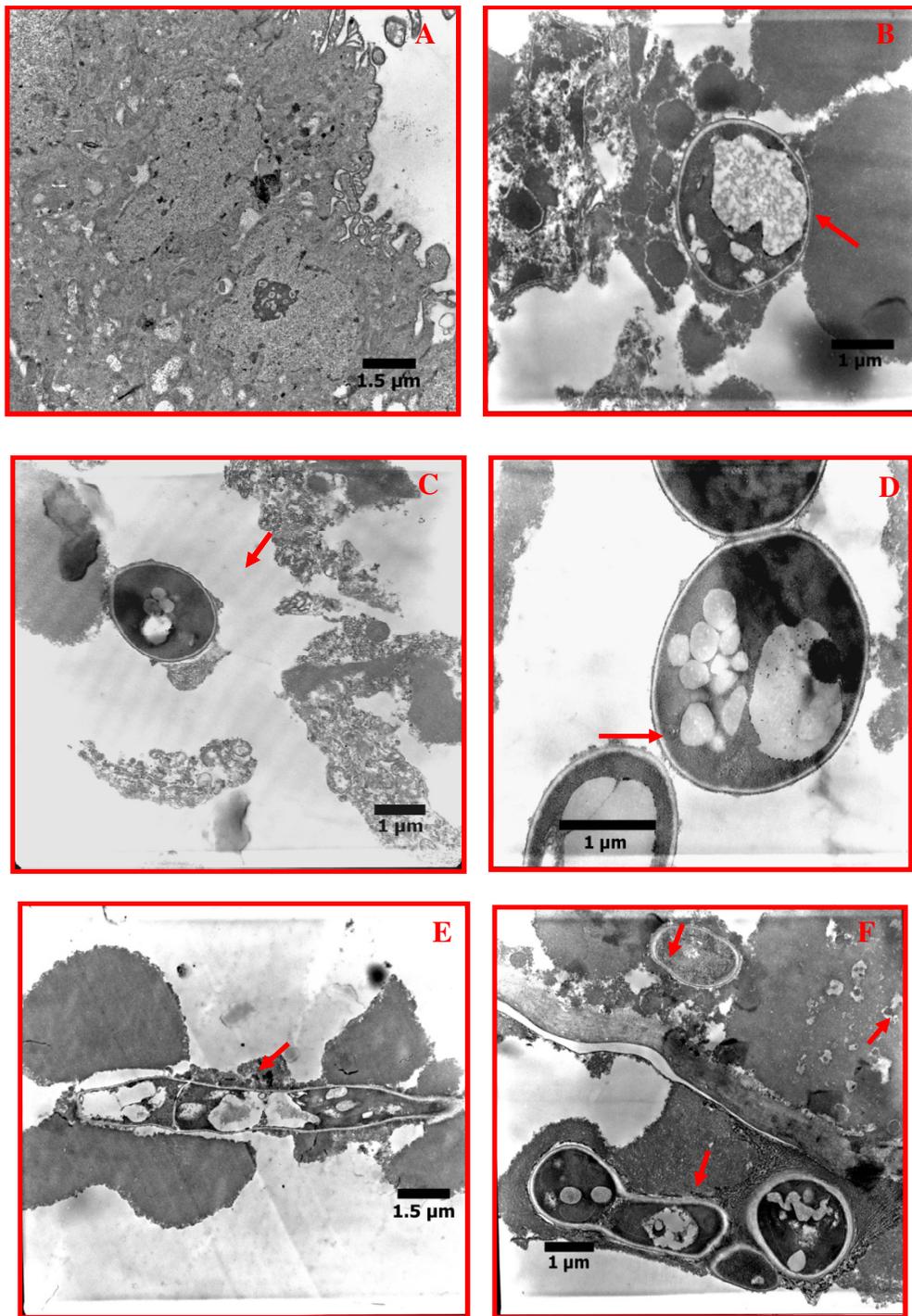


Figura 34. Microscopía electrónica de transmisión en huevos de *M. pallidipennis* a las 156 h de haber sido infectados con *Metarhizium anisopliae* (EH-473/4). (A) Tejido embrionario con células que conservan su forma y núcleo. (B y C) Conidios (flecha) con pared celular mostrando la capa externa (electrodensa) y capa interna (electrotranslúcida) y vesículas citoplásmicas heterogéneas con vesícula electrotranslúcida de material floculoso, en contacto con material que sugiere hemolinfa coagulada del insecto. (D) Conidios con pared celular interna electrotranslúcida, externa electrodensa, vesículas citoplásmicas heterogéneas, y vesícula con material flocular y detritus. (E) Cuerpo hifal con septo y cuerpos de Woronin. (F) Conidio fúngico rodeado de material mencionado anteriormente y hemocito degradado dentro del embrión; fuera de la pared del embrión se observa un conidio germinando con un segmento de la pared celular del tubo germinativo en unión con el material que sugiere hemolinfa coagulada (flecha).

8. DISCUSIÓN

Se seleccionó como material de estudio la especie *Meccus pallidipennis* por ser transmisor de la enfermedad de Chagas, de hábitos peridomésticos, amplia distribución en el país y por su facilidad para obtener el ciclo de desarrollo en condiciones de laboratorio.

Para asegurar el número de ejemplares necesarios en los bioensayos de virulencia fue necesario conocer la dinámica de población en *Meccus pallidipennis*. Los factores biológicos más importantes fueron: tasa de eclosión, tiempo de desarrollo entre un estadio y otro, porcentaje de mortalidad en cada estadio y número de huevos ovipuestos por hembra. El ciclo de desarrollo de un triatómino varía de acuerdo a la especie, condiciones ambientales y la disponibilidad de alimento (Martínez-Ibarra y Katthain-Duchateau, 1999).

La comparación de ciclos de vida entre triatóminos es complicada, debido a la gran diversidad de diseños experimentales que se utilizan para su análisis. El promedio de desarrollo de huevo a adulto en *Meccus pallidipennis* en este estudio fue de 193.8 días (rango de 137-241 días), un promedio mayor que en el estudio de Martínez-Ibarra y Katthain-Duchateau (1999), en el cual señalan un promedio de 168.7 días (rango de 131-199 días) bajo condiciones similares pero con otra fuente de alimento, que en su caso fue de gallinas. Otro estudio señala que con disposición del alimento cada 25 días completan su ciclo en un promedio de 167.21 días; cada 35 días en 226-92 y cada 45 días el ciclo tardó más, con un promedio de 372.91 días (Bautista et al., 2001). Todos estos datos muestran que, entre más frecuentemente se alimenten los triatóminos es menor el tiempo de desarrollo. De manera general, *M. pallidipennis* es una especie que necesita menos tiempo para desarrollarse en comparación con otras especies de triatóminos (*Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius robustus* y *Triatoma barberi*) en condiciones de laboratorio.

El tiempo de desarrollo del ciclo de vida refleja como ciertas condiciones controladas en el laboratorio (i.e., la temperatura, la humedad y fuente de alimentación), pueden proveer óptimas condiciones para esta especie y así asegurar el material necesario para los bioensayos.

De igual forma, las tasas de eclosión de huevo a ninfa 1 en las diferentes especies de triatóminos varían, generalmente son arriba del 80% (Martínez-Ibarra y Katthain-Duchateau, 1999). La tasa de eclosión que obtuvimos en este estudio fue del 70% (56 de 80 huevos) con un promedio de incubación de 18 días (rango 15–23 días); estos datos son similares a los de Martínez-Ibarra y Katthain-Duchateau (1999) donde mencionan un 60% de eclosión de una grupo de 200 huevos. En nuestro estudio, la cantidad de huevos que se obtuvieron semanalmente fue suficiente

para iniciar los bioensayos de virulencia, y el porcentaje de eclosión de los testigos fue similar al obtenido en los estudios previos realizados en la colonia de triatóminos.

Los bioensayos bajo condiciones controladas, permitieron evaluar la virulencia y el potencial como hongos entomopatógenos de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* contra el estadio de huevo del insecto transmisor de la enfermedad de Chagas, *M. pallidipennis*. Se han evaluado diversos modelos de infección de hongos en triatóminos, probando no solamente métodos de aspersión (rociamiento, inmersión, pulverización), sino la utilización de diversos formulantes como Tween 80, Tween 20, aceite mineral y además diferentes concentraciones de conidios. El método de este estudio fue la infección de los huevos de *M. pallidipennis* con una cantidad puntual de conidios para poder comparar la eficiencia de las dos especies fúngicas utilizadas. Sin embargo, en otros estudios, se desconoce la cantidad exacta de conidios utilizados, ya que usan únicamente una suspensión conocida de conidios para la infección del insecto (Enríquez, 2004; Lara Da Costa et al., 2003; Lecuona et al., 2001; Luz et al., 1998a; Luz y Batagin, 2005; Melgar et al., 2004; Rocha y Luz, 2011).

Se escogió el estadio de huevo de *Meccus pallidipennis*, ya que se ha observado un efecto nulo de los insecticidas químicos en este estadio de los triatóminos, a menos que se hiciera un segundo y tercer rociado, uno o dos meses después de la primera aplicación, según la OMS, debido a una escasa acción residual o falta de toxicidad para los huevos (Cortico-Correa et al., 2002; Pedrini et al., 2009). Existen lugares donde ocurre re-infestación de casas, en las que una posible causa es debido a que los piretroides no afectan este estadio del transmisor (Ramsey et al., 2003b; Rojas-Wastavino et al., 2004), ya que son más resistentes a los insecticidas que otros estadios de desarrollo, el control biológico de insectos transmisores de enfermedades debería ser una parte fundamental en los programas de manejo integral de plagas (MIP) (Cortico-Correa et al., 2002; Zerba et al., 1999). El difícil control de los huevos de triatóminos, puede estar asociado a la morfología del huevo de este transmisor, ya que el corio protege al embrión de situaciones ambientales. El corio está constituido por varias capas de polifenoles, proteínas y ácidos grasos (cobertura de cera) (Juárez y Fernández, 2007), y presenta una ornamentación donde predominan los hexágonos (Aldana, 2008) que evitan la penetración de los insecticidas químicos. Sin embargo, los hongos entomopatógenos consumen hidrocarburos de la cutícula de los insectos en una forma significativa y tienen la habilidad de degradar los mayores componentes de la cutícula de los insectos, una razón más para considerarlos parte del control biológico (Crespo et al; 2000;

Charnley y St. Leger, 1991; Juárez y Fernández, 2007; Napolitano y Juárez, 1997; Pedrini et al., 2009).

En triatóminos resistentes a piretroides se ha observado un alto contenido de hidrocarburos y el engrosamiento de la cutícula, lo que puede estar relacionado con la disminución en la penetración de piretroides y de esta forma disminuir la dosis efectiva del insecticida (Pedrini et al., 2009). Se ha demostrado que el uso de hongos entomopatógenos no genera riesgo de desarrollar resistencia en los insectos (Thomas y Read, 2007b).

El uso de agentes microbianos como los hongos entomopatógenos sería una manera útil de controlar a *M. pallidipennis*, ya que estos hongos han sido exitosamente probados en plagas agrícolas (Castellanos-Moguel et al., 2007; 2008; Hernández-Velázquez y Toriello, 2008; Montoya-Sansón, 2006; Moya-Raygoza, 2008; Thomas y Read, 2007b) y en otros insectos transmisores de enfermedades parasitarias (Blandford et al., 2005; Lwetoijera et al., 2010; Ngumbi et al., 2011; Scholte et al., 2003). Un beneficio adicional en la utilización de estos hongos entomopatógenos es que son inocuos para el humano y animales (Mier et al., 2005; Toriello, 2003; Toriello et al., 2006; 2008).

Las cepas utilizadas en este estudio, *I. fumosorosea* (EH-511/3) y *M. anisopliae* (EH-473/4), han sido aisladas de hospederos insectos como *Bemisia* sp. (Hemiptera: Aleyrodidae) y *Aeneolamia* sp. (Hemiptera: Cercopidae), respectivamente, encontrados en cultivos agrícolas de la República Mexicana. Ambas especies de hongos entomopatógenos son nativas, atacan hemípteros y poseen alta virulencia contra insectos que son plagas agrícolas (Zavala, 2005; Castellanos-Moguel, 2006 y Montoya-Sansón, 2006), además de ser revigorizadas constantemente en el laboratorio para que no pierdan su virulencia. En general, las cepas nativas de un país son más virulentas contra los hospederos insectos de la región que aquellas aisladas en otros países, ya que en el país de origen se encuentran todas las condiciones óptimas para su reproducción en el hábitat respectivo (Bidochka y Small, 2005).

La viabilidad de conidios en los ensayos de virulencia de CL_{50} ($93.20\% \pm 1.16762$) y de TL_{50} (*I. fumosorosea* $93.83\% \pm 3.32916$ y *M. anisopliae* $93.66\% \pm 2.51661$) fueron los óptimos para la realización de los bioensayos y para su formulación con Tween 80 al 0.5%. Estos resultados difieren ligeramente del 100% de viabilidad en conidios obtenida para ensayos contra el transmisor *T. infestans* (Marti et al., 2005). Esto podría ser debido a los diferentes métodos para

medir la viabilidad. En nuestro estudio se llevó a cabo por el porcentaje de germinación a las 10 h (*I. fumosorosea*) o 12 h (*M. anisopliae*) en medio de agar papa dextrosa.

Los conidios de ambos hongos entomopatógenos fueron formulados con Tween 80 al 0.5% estéril (no iónico), ya que los conidios de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* son hidrofóbicos. Se ha investigado el efecto de adyuvantes, tales como surfactantes (Surfax 220) (aniónico) y aceites vegetales (linaza, oliva, etcétera), concluyendo que la combinación de surfactantes aniónicos e iónicos pueden producir bioplaguicidas más estables. De manera general, los surfactantes no iónicos son considerados menos tóxicos que los iónicos (Luz y Batagin, 2005).

Uno de los aspectos más importantes en la virulencia de hongos entomopatógenos es la relación entre la concentración de conidios a la cual se expone un organismo y el efecto nocivo que le producen estos; esta relación es conocida como dosis-respuesta y es la base para la evaluación de la eficacia del entomopatógeno (Mancebo-Markis, 2009). Nuestros dos parámetros para medir la virulencia del entomopatógeno fueron la CL_{50} y TL_{50} .

Para determinar la CL_{50} se probaron cinco diferentes dosis del hongo *I. fumosorosea*: 1×10^7 , 3×10^6 , 1×10^6 , 3×10^5 y 1×10^5 conidios/mL. La CL_{50} obtenida fue de 2.263×10^2 (226.349 conidios por huevo), la cual mostró una alta virulencia, ya que entre menor sea la concentración de conidios utilizada que mate al 50% de los insectos prueba, mayor es la virulencia de la cepa.

En otras investigaciones, la cepa EH-511/3 utilizada en este estudio, ha resultado altamente virulenta contra ninfas de segundo estadio de *Trialeurodes vaporarum* (Hemiptera: Aleyrodidae) a una CL_{50} de 6.9×10^3 conidios/mL. Otros aislados de México de *I. fumosorosea* como EH-506/3 y EH-503/3, han mostrado también alta virulencia al ser utilizados a bajas concentraciones (Castellanos-Moguel et al., 2007; 2008).

En un trabajo reciente, se investigó la virulencia de la cepa IP 34 de *Metarhizium robertsii* e IP 141 de *Isaria cateniannulata* contra ninfas 3 de *Triatoma infestans*, encontrando que la CL_{50} fue de 1.3×10^2 y 2.8×10^3 CFU/cm², respectivamente (Rocha y Luz, 2011). En otra investigación con el hongo, *Beauveria bassiana*, Romaña y Fargues (1992) encontraron una CL_{50} de 4.6×10^3 conidios/cm² en el estadio de huevo del transmisor *Rhodnius prolixus*. En nuestro trabajo se encontró que la cepa de *I. fumosorosea* estudiada fue muy virulenta hacia el estadio de huevo de *M. pallidipennis*, ya que se obtuvo una CL_{50} de 2.263×10^2 conidios/mL.

En nuestros resultados las concentraciones más altas (1×10^7 , 3×10^6 y 1×10^6 conidios/mL equivalentes a 20,000, 6,000 y 2000 conidios por huevo) presentaron mortalidades mayores al

90%, y las concentraciones más bajas (3×10^5 y 1×10^5 equivalentes a 600 y 200 conidios por huevo) menos del 80% de mortalidad acumulada, sugiriendo una elevada mortalidad causada por el hongo entomopatógeno.

En los huevos testigos utilizados en la prueba de CL_{50} , la tasa de eclosión fue del 86% (31/36), en el TL_{50} para *I. fumosorosea* 76% (19/25) y en *M. anisopliae* 72% (18/25), porcentajes similares a los obtenidos en el ciclo de desarrollo de *M. pallidipennis* que fue del 70% (56/80). Estas tasas de eclosión experimentales demostraron que la desinfección de huevos no afectó la eclosión de huevos a ninfas 1, y que los hongos entomopatógenos fueron los que causaron la pérdida de viabilidad en los huevos infectados, ya que a los testigos sólo se les aplicó el vehículo y continuaron su ciclo de desarrollo.

Dos factores importantes que influyen en las infecciones por hongos entomopatógenos son la temperatura y humedad. Los bioensayos realizados en este estudio fueron llevados a cabo bajo condiciones favorables, i. e., 28°C y 60% HR, a diferencia de otros hongos como *B. bassiana* que necesitan humedades cercanas a la saturación del 90% HR (Cazorla-Perfetti et al., 2007; Lazzarini et al., 2006; Lecuona et al., 2001).

Se observó que el estadio de huevo de *M. pallidipennis* presentó una mortalidad acumulada del 92% y un TL_{50} de 66.685 h o 2.77 días cuando fueron expuestos a la cepa EH-511/3 de *Isaria fumosorosea*, lo cual significa que esta cepa fue capaz de matar al 92% del total de los individuos (69/75) al final del experimento (10 días). En comparación, la mortalidad acumulada del 88% y un TL_{50} de 76.320 h o 3.18 días se obtuvo cuando fueron expuestos a la cepa EH-473/4 de *M. anisopliae*. Ambos entomopatógenos fueron probados a una dosis de 3×10^5 , equivalente a 600 conidios por huevo. Estos resultados demuestran la virulencia de estos hongos para el estadio de huevo del triatomino estudiado. Estudios previos demuestran que un hongo entomopatógeno efectivo es el que mata a su hospedero en siete días (Melgar et al., 2004), y nuestros resultados demuestran una mortalidad arriba del 80% en menos de cuatro días.

Lecuona et al. (2001) probó una cepa de *B. bassiana* sobre huevos de *T. infestans*, y reporta emergencia de las ninfas, sin embargo, murieron después de emerger. Por otro lado Romaña y Fargues (1992) reportan que la mayoría de los bioensayos con *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *Nomuraea rileyi* muestran mortalidad acumulada baja en el estadio de huevo. Esto probablemente se debe a las cepas utilizadas, sin embargo, nuestros resultados, muestran que ambos hongos impidieron la emergencia de las ninfas.

Ambos hongos utilizados se comportaron de manera similar en la infección de huevos de *M. pallidipennis*, ya que al comparar su virulencia no se observaron diferencias significativas.

I. fumosorosea (= *Paecilomyces fumosoroseus*) ha sido considerada virulenta en ninfas 1 de *Rhodnius prolixus*, causando mortalidades del 80% al 100%, y en comparación con *M. anisopliae*, que causo del 20% al 55% de mortalidad a concentraciones de 3×10^5 (Romaña et al., 1987).

En un estudio de Enríquez (2004) en Guatemala se señaló que la cepa AES.MET.GC de *M. anisopliae* fue efectiva para huevos de *T. dimidiata*, ya que presentó una mortalidad acumulada del 95.2%, a una concentración de 2×10^5 conidios/mL por aspersion a los 30 días. En otro estudio del mismo hongo pero en ninfas 3 de *T. infestans*, se encontró que las cepas CG 144 y CG 491 del mismo hongo fueron capaces de causar entre el 85 al 90% de mortalidad acumulada (Luz et al., 1998a). Se han probado también cepas aisladas en Guatemala de *M. anisopliae* en ninfas 1 de *T. dimidiata*, mostrando un TL_{50} de 5.5 a 6.6 días (Melgar, 2004). En otros transmisores, como *Phlebotomus duboscqui* (Diptera: Psychodidae) (transmisor de leishmaniasis), el mismo hongo ha mostrado un TL_{50} de 3-0 a 7.8 días (Ngumbi et al., 2011). En *Anopheles arabiensis* y *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae), (transmisores de malaria), *M. anisopliae* ha mostrado TL_{50} de 2.0 y 3.7, respectivamente (Lwetoijera et al., 2010; Scholte et al., 2005). Y por otro lado, utilizando la misma cepa de *M. anisopliae* de nuestro estudio (EH-473/4), se obtuvo un TL_{50} de 6.53 días con una mortalidad del 100% pero en otro insecto hospedero, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). Estos datos apoyan la elevada virulencia de la cepa EH-473/4 de *M. anisopliae* para el estadio de huevo de *M. pallidipennis* (Toriello et al., 2008; Zavala-Ramírez, 2005). En el estudio de Rocha y Luz (2011), el TL_{50} en las cepas IP 34 de *Metarhizium robertsii* e IP 141 de *Isaria cateniannulata* fue de 5.7 y 5.6 días respectivamente a una concentración de 2.33×10^5 CFU/cm².

Los hongos entomopatógenos más utilizados en bioensayos con triatóminos son *M. anisopliae*, *B. bassiana* y en menor grado *Aspergillus giganteus*, *Penicillium corylophilum*, *Evachlovaea sp.* y *Paecilomyces lilacinus* (estos tres últimos no son agentes promisorios de control biológico por su baja virulencia). Los transmisores de la enfermedad de Chagas donde se han estudiado son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus*, *T. sordida*, *T. brasiliensis*, *T. picturata*, *Dipetalogaster maxima* y *T. dimidiata* (Enríquez, 2004; Lara Da costa et al., 2003; Lecuona et al., 2001; Luz et al., 1998b; 1999b; 2003; 2004; Luz y Batagin, 2005; Melgar et al., 2004; Rocha et al., 2011).

El hecho de que *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* presenten alta virulencia, causando daño en los huevos de *M. pallidipennis* podría ser prometedor, ya que como se ha mencionado, una de las causas de re-infestación en áreas endémicas de la enfermedad de Chagas es debido a que los huevos no son afectados por los insecticidas químicos utilizados para su control.

En la observación microscópica, se observaron las primeras hifas emitidas por *I. fumosorosea* a las 36 h, en comparación con 60 h requeridas para observar la presencia de hifas en *M. anisopliae*. Inicialmente se pudieron observar saliendo de la zona del opérculo (parte más blanda) y posteriormente alrededor de todo el corio. El proceso de infección ocurre en pocas horas después de la infección del insecto, por ejemplo, Neves y Alves (2004) muestran por microscopía de barrido que la adhesión de conidios de *M. anisopliae* en el tegumento de *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) ocurre entre las 6 y 12 h después de la infección; la penetración ocurre entre las 12 h y 24 h y la diseminación del hongo en el insecto entre 24 h y 72 h (Neves y Alves 2004). Sin embargo, no conocemos este mecanismo en la relación hongos/triatóminos, más que lo descrito en nuestro estudio.

Los cambios en la coloración de los huevos infectados por los hongos pudieron deberse a la degradación enzimática del corion que está compuesto principalmente por varias capas de polifenoles y proteínas (Aldana, 2008) y a la acción de toxinas como las beauvericinas producidas por *I. fumosorosea* y las destruxinas producidas por *M. anisopliae* (Kershaw et al., 1999), que causan perturbación en la metamorfosis y en los mecanismos de defensa (Pires et al., 2009). En ninfas de mosquita blanca, *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), los signos de la micosis también son perceptibles al día cinco y se manifiestan con el cambio de color de la cutícula y deshidratación de la misma (Jiménez-Toledano, comunicación personal). Otra de las explicaciones a los cambios de color observados, se pudiera comprender por lo señalado sobre la capacidad de los entomopatógenos para inducir defensas en el hospedero, una de ellas es la producción de fenoles, como una medida de resistencia hacia los hongos. La oxidación y polimerización de compuestos fenólicos, típicamente se manifiesta por la producción de pigmentos melánicos de color negro o café, y que es una característica común de respuesta en muchos insectos a la infección. En muchos casos, la penetración en la epicutícula representa la primera interacción que resulta en la melanización. La respuesta melánica subsecuentemente se extiende en la procutícula y se muestra como una cubierta que rodea a la hifa que penetra, o como un parche oscuro que cubre el sitio de infección (Charnley y St. Leger, 1991).

Los datos de porcentaje de esporulación y cantidad de conidios por huevo infectado son datos adicionales sobre el comportamiento de las cepas en cuanto a la colonización del insecto y nos habla de la capacidad de reproducción de los hongos entomopatógenos. Se observó esporulación en el 87% de huevos infectados por *I. fumosorosea* y el 83% en los huevos infectados por *M. anisopliae*, que representan un porcentaje de esporulación mayor a los presentados por otros hemípteros como *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) que van del 38.7% al 52.8% (Ibarra-Aparicio et al., 2005). La esporulación o desarrollo de ambos hongos sobre el huevo de triatóminos puede estar influenciado tanto por factores bióticos como abióticos tales como temperatura, humedad, aislado, dosis del inóculo, lo cual ha sido señalado también en el trabajo de Luz et al. (1999a). Nuestras condiciones de temperatura (28°C) y HR (60%) fueron controladas y favorecieron el crecimiento de ambos hongos entomopatógenos en los huevos de triatóminos. Además de los factores arriba mencionados, que podrían influir en los huevos que presentaron solamente micelio y no esporularon, son por ejemplo, una posible competencia con otros hongos o bacterias que le impiden al entomopatógeno desarrollarse; también se ha observado que en algunos insectos de plagas agrícolas como langostas, no se observa el crecimiento fúngico, pero sin embargo, el insecto muere después de la aplicación del hongo (Hernández-Velázquez, comunicación personal). Por otro lado, entre los hongos entomopatógenos existe mucha diversidad en la producción de toxinas para matar al insecto, y en ocasiones son éstas que lo eliminan y no se observa una esporulación.

Con respecto a la determinación de conidios por huevo, no se encontraron diferencias significativas entre los dos hongos estudiados en los huevos del insecto; datos similares en la producción de conidios se han encontrado en ninfas de otras especies peridomésticas de triatóminos, como *Panstrongylus herreri*, *P. megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *T. lecticularia*, *T. picturata*, *T. rubrovaria*, *T. infestans*, *D. máxima* y *Rhodnius prolixus* (Luz et al., 1998b).

La cantidad de conidios por huevo infectado sugiere que la cepa EH-511/3 de *I. fumosorosea* podría tener gran capacidad de dispersión, capacidad de reciclarse en el ambiente y éxito al interactuar sobre su hospedero en campo, ya que para causar epizootias en poblaciones de insectos es necesario que las cepas esporulen adecuadamente (Ibarra-Aparicio et al, 2005; Liu et al., 2003; Luz et al., 1999a).

Para explorar el mecanismo de infección de estos hongos en el estadio de huevo de *M. pallidipennis* y corroborar la entrada de los hongos y destrucción del embrión, se llevó a cabo la microscopía electrónica de transmisión (MET). La anatomía interna de los huevos de triatóminos la

describen Barth y Muth (1958), Picollo y Zerba (1997) y Takashi-Obara et al. (2007), donde se observaron las estructuras de los huevos. Una de las características que llama la atención de las imágenes de la MET es el material que se observa, casi en todas las imágenes, alrededor de las estructuras fúngicas como conidios y cuerpos hifales, que sugiere hemolinfa coagulada, lo cual probablemente sugiere un mecanismo de defensa por parte del triatómino, tratando de oxidar y encapsular al hongo; esto se conoce en otros invertebrados transmisores como un mecanismo de fagocitosis por encapsulación con hemolinfa (Kanost et al., 2008), sin embargo, se necesitarían de estudios de histoquímica para su confirmación. Las enzimas que intervienen en este proceso oxidativo son las fenoloxidasas (PO), las cuales se encuentran presentes en la hemolinfa, éstas son activadas como parte de una cascada de proteasas estimuladas por reconocimiento de patógenos. La síntesis de melanina ocurre en respuesta a diversas infecciones por patógenos; en la mayoría de los casos, esta defensa parece proteger al insecto hospedero. Tal encapsulación usualmente involucra la adherencia de múltiples capas de hemocitos en la superficie del patógeno, pero en algunos casos, la cápsula está formada de material acelular como proteínas plasmáticas, moléculas liberadas de los hemocitos y melanina. La melanización de patógenos encapsulados es una respuesta importante de defensa, en insectos (Zimmerman, 2007), inclusive en aquellos que son transmisores de enfermedades parasitarias como *Anopheles gambiae* en malaria. La melanización de patógenos encapsulados puede bloquear la absorción de nutrientes por parte del patógeno y así contribuye en eliminarlo inhibiendo su alimentación; además se forman intermediarios de oxígeno reactivo citotóxico y nitrógeno durante la síntesis de melanina, los cuales también influyen en la eliminación del patógeno (Kanost et al., 2008). En nuestro estudio la MET de *I. fumosorosea* (EH-511/3) y *M. anisopliae* (EH-473/4) mostró que a pesar de que los conidios estuvieron envueltos de posible hemolinfa coagulada, se logró una infección exitosa. Otra posible explicación acerca del material observado alrededor de los propágulos fúngicos es que podría tratarse de material mucilaginoso propio de éstos, lo cual ha sido reportado también en infecciones de otros insectos por hongos entomopatógenos (Boucias y Pendland, 1991), aunque tales afirmaciones necesitarían estudios más específicos como se mencionó anteriormente. Hasta ahora, se conoce muy poco acerca de las propiedades físicas o bioquímicas de este material mucilaginoso. En nuestro estudio se observó mediante la MET la presencia de detritus celular en vesículas citoplásmicas heterogéneas en conidios y segmentos hifales, lo que sugiere una activa metabolización de nutrientes por la célula fúngica, posiblemente adquiridos del embrión ya que éste se observa totalmente destruido. Hasta el momento no se conoce acerca de los mecanismos

involucrados en la infección y penetración de los hongos entomopatógenos en transmisores de *Trypanosoma cruzi*.

Se han realizado diversos avances en el conocimiento de los procesos de germinación y penetración de los hongos entomopatógenos en insectos de importancia agrícola, utilizando la microscopía electrónica (Neves y Alves, 2004), pero hasta ahora no se conocen estudios de hongos entomopatógenos en triatóminos.

La MET en nuestro estudio mostró una gran diversidad de estructuras fúngicas para ambos hongos estudiados dentro del huevo, como conidios, cuerpos hifales, blastosporas, hifas, asociadas en su mayoría con material posiblemente mucilaginoso o hemolinfa coagulada descritos con anterioridad. Llamó la atención la proximidad de este material con los hemocitos degradados del embrión.

En la infección de huevos de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) con *M. anisopliae*, en MET se describieron los cuerpos hifales como estructuras que muestran diferentes tamaños y formas con el citoplasma lleno de vesículas de diversos tamaños, se multiplican por fisión binaria, y esto hace que incrementen el tamaño, siendo más grandes conforme avanza el tiempo de colonización (Pires et al., 2009). En nuestros resultados, se observaron los cuerpos hifales con el citoplasma lleno de vesículas de diversos tamaños, similar a lo encontrado en el interior de los huevos de la polilla del tomate (Pires et al., 2009).

En otro estudio también con MET, en adultos del insecto *Ceroplastes japonicus* (Hemiptera: Coccoidea) infectado con *Lecanicillium lecanii*, se observaron distintos propágulos fúngicos y a las 144 h el hongo emergió del insecto formando los conidióforos característicos y esporulando en la superficie del insecto (Liu et al., 2009). De manera similar en nuestro estudio existe la correlación entre la esporulación y la observación de los propágulos fúngicos en el mismo tiempo.

En el campo, se han probado formulaciones de hongos entomopatógenos como *B. bassiana* para controlar *T. infestans* y *T. sordida*, señalando que a veces la extrapolación de mortalidad acumulada alta en el laboratorio, puede verse disminuida en el campo (Luz et al., 1999b; Luz et al., 2004), aún con concentraciones altas, por lo que es necesario realizar estudios en campo donde se establezca un método de aplicación y tiempo de exposición al hongo, así como los estudios de bioseguridad pertinentes (Toriello, 2003; Zimmermann, 2008).

Los hongos entomopatógenos dañan de manera natural muchas especies de insectos, y en algunos aspectos son muy adecuados para su desarrollo como bioplaguicidas, ya que pueden ser producidos en masa *in vitro*, almacenados por períodos prolongados y sus conidios pueden ser aplicados con equipos convencionales (Jackson et al., 2010). Los hongos infectan a través del contacto externo (Thomas y Read, 2007b) a diferencia de los virus y bacterias que necesitan ser ingeridos para infectar a los insectos. En comparación con la mayoría de los insecticidas químicos, los hongos son una alternativa de bajo riesgo, sin efecto en los mamíferos e impacto ambiental reducido.

Un aislado fúngico altamente virulento que produzca grandes cantidades de conidios en los cadáveres, puede ser considerado para el control de estos transmisores (Luz et al., 1999a); en nuestro estudio la cepa EH-511/3 de *I. fumosorosea* presentó mayor cantidad de conidios, por lo que podría ser la especie candidata para pruebas en campo, aunque ambas especies de hongos entomopatógenos, podrían ser candidatos promisorios para el control de este triatominio

En México, este es el primer trabajo con hongos entomopatógenos para el control biológico de huevos de *M. pallidipennis*, el cual se encuentra principalmente en áreas peridomésticas. Este procedimiento de control biológico con hongos entomopatógenos puede ser aprovechado en el peridomicilio, ya que este ecotopo es considerado el punto más crítico en el control de los transmisores en la enfermedad de Chagas.

Los resultados de este estudio pueden auxiliar en el desarrollo de nuevas estrategias para el control de los transmisores en la enfermedad de Chagas, particularmente a nivel del peridomicilio, donde las acciones actuales (uso de insecticidas químicos) han fracasado. Esta metodología simple, sustentable y de bajo costo puede ser aplicada sola o combinada con otras acciones de control.

9. CONCLUSIONES

- Este trabajo representa el primer reporte de virulencia de *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae* en el estadio de huevos de *Meccus pallidipennis*, transmisor del agente etiológico de la enfermedad de Chagas.
- Ambas especies de hongos entomopatógenos son de alta virulencia hacia el huevo por presentar un TL₅₀ menor a cuatro días, ya que la cepa EH-511/3 de *I. fumosorosea* presentó una mortalidad acumulada del 92% a los 10 días y un TL₅₀ de 66.685 horas (2.77 días) y la cepa EH-473/4 de *M. anisopliae* presentó una mortalidad acumulada del 88% a los 10 días con un TL₅₀ de 76.320 horas (3.18 días).
- *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* se comportaron de manera similar en la infección de huevos de *M. pallidipennis*, debido a que no mostraron diferencias significativas respecto a la mortalidad acumulada a los tres (F = 8.0; t = 1.162; g.l.= 4; P = 0.310), seis y nueve días (F = 0.800; t = 0.775; g.l.= 4; P = 0.482).
- El aislado que produjo mayor cantidad de conidios por huevo infectado fue EH-511/3 de *I. fumosorosea* $8.9 \times 10^7 \pm 2.9 \times 10^7$, observándose diferencias estadísticamente significativas (F= 2.785; t = 2.934; g.l.= 22; P= 0.008).
- Ambas especies tienen la capacidad de interrumpir tempranamente el ciclo de vida del insecto transmisor, debido a que los resultados mostraron que ambas cepas, la EH-511/3 de *I. fumosorosea* y la EH-473/4 de *M. anisopliae*, son capaces de causar una infección rápida y pérdida de viabilidad en los huevos de *M. pallidipennis*.

- Se comprobó la infección del huevo con *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* mediante la MET al observar hifas con septos y cuerpos hifales con vesículas citoplasmáticas heterogéneas en el embrión de *M. pallidipennis* infectado.
- La aplicación de *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae* en los sitios factibles de ser colonizados por *Meccus pallidipennis*, podría utilizarse como una alternativa para el control biológico de este transmisor.
- Ambas especies pueden ser consideradas como agentes microbianos potenciales para el control biológico de la enfermedad de Chagas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Albano-Amóra SS, Leal-Bevilaqua CM, Carneiro-Feijó FM, De Macedo Assuncao-Pereira RH, Dutra-Alves N, De Morais-Freire FA, Toth-Kamura M, Magalhaes-De Oliveira D, Luna-Alves Lima EA, Gadelha-Rocha MF. 2010. **The effects of the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* on different stages of *Lutzomya longipalpis* (Diptera: Psychodidae).** Acta Trop 113: 214-220.
- Aldana E. 2008. **Morfología construccional del huevo de los triatominos.** Tesis de maestría, Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.
- Bautista NL, García-De la Torre GS, De Haro-Arteaga I, Salazar-Schettino PM. 1999. **Importance of *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) as a vector of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the state of Morelos, Mexico and posible ecotopes.** J Med Entomol 36: 233-235.
- Bautista NL, Rojas G, De Haro I, Bucio M, Salazar-Schettino PM. 2001. **Comportamiento biológico de *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) en el estado de Morelos México.** Bol Chil Parasitol 57: 22-27.
- Barth R y Muth H. 1958. **Estudios anatomicos e histológicos sobre a subfamilia Triatominae (Heteroptera, Reduviidae).** Mem Inst Osw Cruz 56: 197-208.
- Barrera JF. 2007. **Introducción, filosofía y alcance del control biológico.** In: Rodríguez-Del Bosque LA, Arredondo-Bernal HC (Eds.). Teoría y aplicación del control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico A.C., México, pp. 1-18.

- Barron GL. 1983. **The Genera of Hyphomycetes from Soil**. Robert E. Krieger Publishing Company. Malabar Florida. pp. 33-35.
- Bidochka JM, Small CL. 2005. **Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus**. In: Vega FE, Blakwell M. (Eds.) *Insect-fungal Associations: Ecology and Evolution*. Oxford University Press, pp.28-50.
- Bischoff JF, Rehner SA, Humber RA. 2009. **A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage**. *Mycologia* 101: 512-530.
- Blandford S, Chan BH, Jenkins N, Sim D, Turner RJ, Read AF, Thomas MB. 2005. **Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission**. *Science* 308: 1638-1641.
- Boucias DG, Pendland JC. 1991. **The fungal cell wall and its involvement in the pathogenic process in insects hosts**. In: *Fungal Cell Wall and Immune Response*. Latgé JP, Boucias D (Eds.) NATO ASI series, Vol. 53. Springer-Verlag. Berlin, pp. 303-316.
- Carcavallo RU, Galíndez-Girón I, Jurberg J, Lent H. 1997a. **Bibliographic checklist of the American triatominae (Hemiptera Reduviidae)**. In: Carcavallo R, Galíndez-Girón I., Jurberg J, Lent H. (Eds). *Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas*, Vol. I. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 15-52.
- Carcavallo RU, Galíndez-Girón I, Jurberg J, Galvao C, Lent H. 1997b. **Macroscopic and exochorial structures of triatominae eggs (Hemiptera, Reduviidae)**. In: Carcavallo R, Galíndez-Girón I, Jurberg J, Lent H (Eds). *Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas*, Vol. II. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 409-448.
- Castellanos-Moguel MJ. 2006. **Estudio de la producción de enzimas, virulencia y diferenciación fúngica en la interacción del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus*/mosquita blanca**. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, UAM-Xochimilco, México.
- Castellanos-Moguel MJ, González-Barajas M, Mier T, Reyes-Montes MR, Aranda E y Toriello C. 2007. **Virulence testing and extracellular subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2) activity during propagule production of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae)**. *Rev Iberoam Micol* 24: 62-68.

- Castellanos-Moguel MJ, Cruz-Camarillo R, Aranda E, Mier T y Toriello C. 2008. **Relationship between protease activity and the virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* in *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae).** Rev Mex Mic 28: 71-80.
- Cazorla-Perfetti DJ, Morales-Moreno P, Acosta-Quintero ME. 2007. **Efectos de gradientes térmicos, salinos y pH sobre la germinación in vitro de un aislado nativo de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, patógeno para *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata*.** Rev Cien, FCV-LUZ 17: 627-631.
- Cortés-Jiménez M, Noguera-Torres B, Alejandro-Aguilar R, Isita Tornell I, Ramírez-Moreno E. 1996. **Frequency of triatomines infected with *Trypanosoma cruzi* collected in Cuernavaca city, Morelos, Mexico.** Rev Latinoam Microbiol 38: 115-119.
- Cortico-Correa VL, Ferra-Filho AN, Olavo da Rocha-Silva E, Kenge-Ishinata G. 2002. **Triatomine: ovicida action of some pyrethroids.** Rev Soc Bras Med Trop 35: 237-241.
- Coscarón MC, Loiacono MS, De Santis L. 1997. **Predators and Parasitoids.** In: Carcavallo RU, Galíndez-Girón I, Jurberg J, Lent H (Eds.). Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas, Vol. III. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. pp. 891-924.
- Crespo R, Juárez MP, Cafferata LFR. 2000. **Biochemical interaction between entomopathogenic fungi and their insect-host like hydrocabons.** Mycologia 92: 528-536.
- Charnley AK, St. Leger RJ. 1991. **The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects.** In: Cole TG, Hoch CH(Eds.). The fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. Plenum Press, New York, pp. 267-286.
- Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. 2002. **The impact of Chagas disease control in Latin America.** Mem Inst Oswaldo Cruz 97: 603-612.
- Domsch KH, Gams W, Anderson TL. 1980. **Compendium of Soil Fungi.** Academic Press, London, pp. 413-415.
- Driver F, Milner RJ, Truemann JWH. 2000. **A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data.** Mycol Res 104:134-150.

Dumonteil E, Ruíz H, Rodríguez E, Barrera M, Ramírez MJ, Rabinovich JE, Menu F. 2004. **Re-infestation of houses by *Triatoma dimidiata* after intradomicile insecticide application in the Yucatán Peninsula, Mexico.** Mem Inst Osw Cruz 99: 253-256.

Enger KS, Ordoñez R, Wilson ML, Ramsey, JM. 2004. **Evaluation of risk factors for rural Infestation by *T. pallidipennis* (Hemiptera:Triatominae), a Mexican vector of Chagas Disease.** J Med Entomol 41: 760-767.

Enríquez ME. 2004. **Evaluación de la virulencia de diferentes cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control biológico de *Triatoma dimidiata*, principal vector del mal de Chagas en Guatemala.** Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos, Guatemala.

Galvao C, Carcavallo R, Da Silva-Rocha D, Jurberg J. 2003. **A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes.** Zootaxa 202: 1-36.

García-Valente F, Ortega-Arenas LD. 2008. **Mosquita blanca, *Trialeurodes vaporarum* (Hemiptera: Aleyrodidae).** In: Arredondo-Bernal HC, Rodríguez-Del Bosque LA (Eds.). Casos de Control Biológico en México. Grupo Mundi-Prensa, México, pp. 167-176.

Hernández-Velázquez VM, Toriello C. 2008. **Langosta voladora, *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orthoptera: Acrididae).** In: Arredondo-Bernal HC, Rodríguez-Del Bosque LA (Eds.). Casos de Control Biológico en México. Grupo Mundi-Prensa, México, pp. 47-55.

Humber RA, Hansen KS, Wheeler MM. 2010. **ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures: Catalog of Species.** p. 462.

<http://www.who.int/es/>

<http://www.lubilosa.org>

<http://www.redtrv.org>

Ibarra-Aparicio G, Moya-Raygoza G, Berlanga-Padilla A. 2005. **Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis*) (Delong y Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae).** Folia Entomol Mex 44: 1-6.

- Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski ST. 2010. **Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol.** *BioControl* 55: 129-145.
- Juárez MP, Fernández GC. 2007. **Cuticular hydrocarbons of triatomines.** *Comp Biochem Physiol* 147: 711-730.
- Kanost MR, Gorman MJ. 2008. **Phenoloxidase in insect immunity.** In: Beckage NE (Ed.) *Insect immunology.* Academic Press, Londres, pp 69-87.
- Kershaw MJ, Moorhouse ER, Bateman R, Reynolds SE, Charnley AK. **The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect.** *J Invertebr Pathol* 74: 213-223.
- Kollien AH, Schaub GA. 2000. **The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae.** *Parasitol Today.* 16 (9): 381-387.
- Lacey LA, Brooks WM. 1997. **Initial handling and diagnosis of disease insects.** In: Lacey L (Ed.) *Manual of Techniques in Insect Pathology.* Academic Press, Londres, pp 1-15.
- Lara Da costa G, Lage De Morales AM, Galvao C. 2003. **Entomopathogenic effect of *Aspergillus giganteus* and *Penicillium corylophilum* on two triatomine vectors of Chagas disease.** *J Basic Microbiol.* 43: 3-7.
- Lazzarini GM, Rocha LF, Luz C. 2006. **Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*.** *Mycol Res* 110:485-492.
- Lecuona RE, Edelstein JD, Berretta MF, La Rossa FR, Arcas JA. 2001. **Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) strains as potential agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae).** *J Med Entomol* 38: 172-179.
- Lent H, Wygodzinsky P. 1979. **Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae and their significance as vectors of Chagas disease.** *Bull Am Mus Nat Hist* 163: 125-520.
- Levine ND, Corliss O, Valdespino JL, Tapia-Conyer R., Salvaterra B., Guzmán Bracho C. 1980. **A newly revised classification of the protozoo.** *J Protozool* 27:1-37.

- Liu H, Skinner M, Brownbridge M, Parker BL. 2003. **Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae).** J Invertebr Pathol 82: 139-147.
- Liu W, Xie Y, Xue J, Gao Y, Zhang Y, Zhang X, Tan J. 2009. **Histopathological changes of *Ceroplastes japonicus* infected by *Lecanicillium lecanii*.** J Invertebr Pathol 101: 96-105.
- Luz C, Tigano MS, Silva IG, Cordeiro CM, Aljanabi SM. 1998a. **Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*.** Mem Inst Oswaldo Cruz 93: 839-846.
- Luz C, Silva IG, Cordeiro CM, Tigano MS. 1998b. ***Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) as a possible agent for biological control of Chagas disease vectors.** J Med Entomol 35: 977-979.
- Luz C, Silva IG, Cordeiro CM, Tigano MS. 1999a. **Sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Triatoma infestans* after infection at different temperatures and doses of inoculum.** J Invertebr Pathol 73: 223-225.
- Luz C, Silva IG, Magalhaes BP, Cordeiro CM, Tigano MS. 1999b. **Control of *Triatoma infestans* (Klug) (Reduviidae: Triatominae) with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.: Preliminary assays on formulation and application in the field.** An Soc Entomol Brasil 28: 101-110.
- Luz C, Rocha LF, Humber RA. 2003. **Record of *Evlachovaea* sp. (Hyphomycetes) on *Triatoma sordida* in the state of Goias, Brazil, and Its activity against *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae.** J Med Entomol 40: 451-454.
- Luz C, Rocha LF, Nery GV, Magalhaes BP, Tigano MS. 2004. **Activity of oil formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in peridomestic areas in central Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz 99: 211-218.
- Luz C, Batagin I. 2005. **Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*.** Mycopathologia 160: 51-62.
- Lwetoijera DW, Sumaye RD, Madmula EP, Kavishe DR, Mnyone LL, Russell TL, Okumu FO. 2010. **An extra domiciliary method of delivering entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* IP 46 for controlling adult populations of the malaria vector, *Anopheles arabiensis*.** Parasit Vectors 3: 1-6.

- Macedo AM, Oliveira RP, Pena SD. 2002. **Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis.** Exp Rev Mol Med 5: 1-16.
- Magallón-Gastélum E, Magdaleno-Peñaloza NC, Katthain-Duchateau G, Trujillo-contreras F, Lozano-Kasten FJ. 1998. **Distribución de los vectores de la enfermedad de Chagas (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) en el estado de Jalisco. México.** Rev Biomed 9: 151-157
- Magallón-Gastélum E, Lozano-Kasten FJ, Bosseno MF, Cárdenas-Contreras R, Ouaiissi A, Breniere SF. 2004. **Colonization of rock pile boundary walls in fields by sylvatic Triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in Jalisco state Mexico.** J Med Entomol 41: 484-488.
- Mancebo-Markis A. 2009. **Uso del paquete Polo Plus para el análisis Probit de hongos entomopatógenos.** In: Fernández-Ruvalcaba M (Ed.) Perspectivas del control biológico parasitario y nuevas alternativas en el sector pecuario. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. Libro Científico no.2.
- Marti GA, Scorsetti AC, Siri A, López-Lastra CC. 2005. **Isolation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) from the Chagas disease vector, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Argentina.** Mycopathologia 159: 389-391.
- Marti GA, López-Lastra CC, Pelizza SA, García JJ. 2006. **Isolation of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (Ascomycota: Hypocreales) from the Chagas disease vector, *Triatoma infestans* klug (Hemiptera: Reduviidae) in an endemic area in Argentina.** Mycopathologia 162: 369-372.
- Martínez-Ibarra JA, Katthain-Duchateau G. 1999. **Biology of *Triatoma pallidipennis* Stal 1945 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions.** Mem Inst Oswaldo Cruz 94: 837-839.
- Melgar S, Landaverde P, Dardón MJ, Enriquez E, Chanquín S. 2004. **Selección de virulencia y caracterización genética de cepas guatemaltecas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, para el control del insecto transmisor de la enfermedad de Chagas, *Triatoma dimidiata*.** DIGI-USAC. pp. 78-82.

- Mier T, Olivares-Redonda G, Navarro-Barranco H, Pérez-Mejía A, Lorenzana M, Pérez-Torres A y Toriello C. 2005. **Acute oral intragastric pathogenicity and toxicity in mice of *Paecilomyces fumosoroseus* isolated from whiteflies.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 88: 103-111.
- Mier T, Toriello C, Ulloa M. 2002. **Hongos microscópicos saprobios y parásitos: métodos de laboratorio.** División de Ciencias Biológicas y de la Salud, primera edición. UAM Xochimilco, Instituto de Biología, UNAM. México D.F., p. 90.
- Moya-Raygoza G. 2008. **Chicharrita del Maíz, *Dalbulus* spp. (Hemiptera: Cicadellidae).** In: Arredondo-Bernal HC, Rodríguez-Del Bosque LA (Eds.). *Casos de Control Biológico en México.* Grupo Mundi-Prensa, México. pp. 1-7.
- Montoya-Sansón EI. 2006. **Efecto de diversos tratamientos y condiciones de cultivo en la viabilidad de conidios y virulencia de *Metarhizium anisopliae* aislado del salivazo (Homoptera: Cercopidae) de los pastos de México.** Tesis de Maestría, UNAM, México.
- Napolitano R, Juárez MP. 1997. **Entomopathogenous fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans*.** *Arch Biochem Biophys* 344: 208-214.
- Navarro-Barranco H, Reyes-Montes MR, Berlanga-Padilla A, Toriello C. 2006. **Tipificación genotípica del hongo *Metarhizium anisopliae* aislado de la mosca pinta de los pastos (Homoptera: Cercopidae) en México.** In: *Memorias del XXIX Congreso Nacional de Control Biológico.* Manzanillo, Colima. Noviembre 5-10. pp 541-544.
- Neves PM, Alves SB. 2004. **External events related to the infection process of *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metharhizium anisopliae*.** *Neotropical Entomol* 33: 51-56.
- Ngumbi PM, Irungi LW, Ndegwa PN, Maniania NK. 2011. **Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill to adult *Phlebotomus duboscqui* (Neveu-Lemaire) in the laboratory.** *J Vector Borne Dis* 48: 37-40.
- Pedrini N, Mijailovsky SJ, Girotti JR, Stariolo R, Cardozo RM, Gentile A, Juárez MP. 2009. **Control of pyrethroid-resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi.** *PLoS Negl Trop Dis* 3: 1-11.

- Picollo MI, Zerba EN. 1997. **Embryogenesis**. In: Carcavallo RU, Galíndez-Girón I, Jurberg J, Lent H (Eds.). Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas Vol. I. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 265-270.
- Pinchin R, De Oliveira-Filho AM, Pereira AC. 1980. **The flushing-out activity of pyrethrum and synthetic pyrethroids on *Panstrongylus megistus*, a vector of Chagas disease**. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 74: 801-803.
- Pires LM, Marques EJ, Wanderley-Teixeira V, Teixeira AA, Alves LC, Alves ES. 2009. **Ultrastructure of *Tuta absoluta* parasitized eggs and the reproductive potential of females after parasitism by *Metarhizium anisopliae***. Micron 40: 255-261.
- Ramsey JM, Ordoñez R, Tello A, Pohls JL, Sánchez V, Peterson A. 2003a. **Actualidades sobre la epidemiología de la Enfermedad de Chagas en México**. In: Ramsey J, Tello A, Pohls JL (Eds.). Iniciativa para la vigilancia y control de la Enfermedad de Chagas en México. Instituto Nacional de Salud Pública. México, pp. 85-105.
- Ramsey JM, Cruz-Celis A, Salgado A, Espinosa L, Ordoñez R, Lopez R, Schofield CJ. 2003b. **Efficacy of pyrethroid insecticides against domestic and peridomestic populations of *Triatoma pallidipennis* and *Triatoma barberi* (Reduviidae: Triatominae) vector of Chagas disease in Mexico**. J Med Entomol 40:912-920.
- Rabinovich J. 1972. **Vital statistics of triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. I *Triatoma infestans* Klug**. J Med Entomol 19: 351-370.
- Rivas-Hernández N, 2011. **Morfología comparada de los huevos de especies mexicanas de triatominos mediante microscopía electrónica de barrido**. Tesis de Maestría, IPN, México.
- Rocha LF, Luz C. 2011. **Activity of *Metarhizium* spp. and *Isaria* spp. from the Central Brazilian Cerrado against *Triatoma infestans* nymphs**. Tran R Soc Trop Med Hyg 105: 417-419.
- Rocha LF, Silva IG, Luz C. 2011. **Activity of some hypocrealean fungi collected in a Cerrado ecosystem against *Rhodnius* spp. (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions**. Acta Trop 18: 63-66.
- Rodríguez-Del Bosque LA. 2007. **Fundamentos ecológicos del control biológico**. In: Rodríguez-Del Bosque LA, Arredondo-Bernal HC (Eds.). Teoría y aplicación del control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico A.C., México. pp. 19-35.

- Rojas-Wastavino GE, Cabrera M, García G, Vences M, Ruíz A, Bucio M, Guevara Y, Escobar A, Salazar PM. 2004. **Insecticide and community interventions to control *Triatoma dimidiata* in localities of the State of Veracruz, Mexico.** Mem Inst Osw Cruz 99:433-437.
- Romaña CA, Fargues J, Pays JF. 1987. **Mise au point d'une méthode biologique de lutte contre les Triatominae, vecteurs de la maladie de Chagas avec des Hyphomycetes entomopathogenes.** Bull Soc Path Ex 80:105-111.
- Romaña CA, Fargues J. 1992. **Relative susceptibility of different stages of *Rhodnius prolixus* to the entomopathogenic hyphomycete *Beauveria bassiana*.** Mem Inst Osw Cruz 87: 363-368.
- Salazar-Schettino PM, Bucio-Torres M, Cabrera-Bravo M, Guevara-Gómez Y, Rojas-Wastavino G, Ruiz-Hernández A. 2002. **Manual de laboratorio para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*.** SSA y UNAM, p. 50.
- Salazar-Schettino PM, De Haro-Arteaga I, Cabrera –Bravo M. 2005. **Tres especies de Triatominos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México.** Medicina (Buenos Aires). 65: 63-69.
- Salazar-Schettino PM, Rojas-Wastavino E, Cabrera–Bravo M, Bucio-Torres M, Martínez-Ibarra JA, Monroy-Escobar MC, Rodas-Retana A, Guevara-Gómez Y, Vences-Blanco MO, Ruiz-Hernández AL, Torres-Gutiérrez E. 2010. **Revisión de 13 especies de la familia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas en México.** J Selva Andina Res Soc 1: 57-80.
- Schofield CJ, Dias JC.1998. **The southern cone initiative against Chagas disease.** Adv Parasitol 42: 1-27.
- Schofield CJ. 2001. **Field testing and evaluation of insecticides for indoor residual spraying against domestic vectors of Chagas disease.** WHO/CDS/WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES)/GCDPP, p. 62
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. 2006. **The future of Chagas disease control.** Trends Parasitol 22: 583-588.
- Scholte EJ, Nijru BN, Smallegange RC, Takken W, Knols BG. 2003. **Infection of malaria *Anopheles gambiae* (s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** Malaria J 2: 29-31.

- Scholte EJ, Ng'habi K, Kihonda J, Takken W, Paaijmans K, Abdulla S, Killeen GF y Knols BG. 2005. **An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes.** Science 308: 1641-1642.
- Siegel JP. 1997. **Testing the pathogenicity and infectivity of entomopathogens to mammals.** In: Lacey L (Ed.) Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, Londres, pp. 325-336.
- Takashi-Obara M, Soares-Barata JM, Nunes da Silva N, Ceretti-Júnior W, Roberto-Urbinatti P, Aristeu da Rosa J, Jurberg J, Galvao C. 2007. **Estudo de ovos de quatro espécies do genero *Meccus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), vetores da doença em Chagas.** Mem Inst Oswaldo Cruz 102: 13-19.
- Thomas MB, Read AF. 2007a. **Fungal bioinsecticide with a sting.** Nat Biotechnol 25: 1367-68
- Thomas MB, Read AF. 2007b. **Can fungal biopesticides control malaria?.** Nat Rev Microbiol 5: 377-383.
- Throne JE, Weaver DK, Chew V, Baker JE. 1995. **Probit analysis of correlated data: multiple observations over time at one concentration.** J Econ Entomol. 88: 1510-1512.
- Toriello C. 2003. **Bioseguridad de *Metharhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Hyphomycete).** Vedalia 10: 107-113.
- Toriello C, Pérez-Torres A, Burciaga-Díaz A. Navarro-Barranco H, Pérez-Mejía A, Lorenzana Jiménez M, Mier T. 2006. **Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittlebugs.** Ecotoxicol Environ Saf 65: 278-287.
- Toriello C, Montoya-Sansón E, Zavala-Ramírez M, Navarro-Barranco H, Basilio-Hernández D, Hernández-Velázquez V, Mier T. 2008. **Virulencia y termotolerancia de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae).** Rev Mex Micol 28: 57-66.
- Tulloch, M. 1976. **The genus *Metarhizium*.** Mycol Soc 66: 407-411.
- Vázquez C, Saldarriaga Y, Pineda F. 2006. **Compatibilidad de *Beauveria bassiana* con fenoxicarb.** Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa rica) 78: 80-85.

- Vidal-Acosta V, Ibañez-Bernal S, Martínez-Campos C. 2000. **Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México.** Salud Publica Mex 42: 496 – 503.
- Wang CH, St Leger RJ. 2007. **A scorpion neurotoxin increases the potency of a fungal insecticide.** Nat Biotechnol 25: 1455-1456.
- Watanabe T. 1994. **Pictorial Atlas of Soil and Seed fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species.** Lewis Publishers, Tokyo, p. 411.
- WHO-World Health Organization. 2002. **Control of Chagas Disease.** WHO Technical Report Series 905: 82-83.
- Zárate LG y Zárate RJ. 1985. **A checklist of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) of Mexico.** Int J Entomol 27: 102-127.
- Zavala-Ramírez M. 2005. **Evaluación de la virulencia de 16 aislados del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* en *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).** Tesis de Licenciatura, UAM-Xochimilco.
- Zerba EN. 1999. **Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors.** Medicina (B Aires) 59: 41-46.
- Zimmerman G. 2007. **Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** Biocontrol Sci Technol 17: 879-920
- Zimmermann G. 2008. **The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control.** Biocontrol Sci Technol.

11. ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo y soluciones

Papa dextrosa agar.

Papa blanca 300 g

Dextrosa (Droguería Cosmopolita®, México) 20 g

Agar (BIOXON®, México) 15 g

Agua destilada 1000 mL

Pelar y rebanar las papas, hervir las rodajas durante ½ h, o hasta que estén cocidas, en un volumen de 500 mL de agua. Decantar y filtrar a través de un cedazo. Añadir la dextrosa y el agar, aforar a 1000 mL con agua, mezclar bien y hervir para disolver el agar. Esterilizar en autoclave durante 30 min. APD es un medio ampliamente utilizado para aislar y favorecer la esporulación de hongos filamentosos (Mier et al., 2002).

Tween 80 al 0.5%

En un matraz de 250 mL, se vierten 100 mL de agua mili Q, y se le quitan 500 μ L de agua, para agregarle el mismo volumen de Tween 80 (Droguería Cosmopolita®, México).

Soluciones de desinfección y humedad

Cloro al 4%: En un vaso de precipitados de 250 mL se vierten 100 mL de cloro al 6% (Cloralex®) y se agregan 50 mL de agua para obtener 150 mL de cloro al 4%. Homogenizar.

Alcohol al 40%: En un vaso de precipitados de 250 mL se vierten 26 mL de alcohol al 96% y se agregan 24 mL de agua mili Q para obtener 50 mL de alcohol al 40%. Homogenizar.

Solución de humedad. En un vaso de precipitados de 250 mL se vierten 13.6 g de sulfato de potasio (K_2SO_4) y se agregan 200 mL de agua para obtener una solución de humedad del 60%. Homogenizar en vórtex.

Medio agar agua al 1%

En un matraz de 1000 mL se ponen 500 mL de agua mili Q o proveniente de la llave, y se le agregan 75 g de agar (BIOXON®, México). Se homogeniza y se esteriliza 120°C, 15 lbs de presión durante 30 min.

Anexo 2. Tabla de registro

La mortalidad acumulada se registró cada 12h, para la CL_{50} y TL_{50} , de igual forma se anotaron todos los datos correspondientes al bioensayo, además de observaciones en el cambio de coloración.

No. Trietoma	DÍAS																													
	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	180	192	204	216	228	240	252	264	276	288	300	312	324	336	348	360
1																														
2																														
3																														
4																														
5																														
6																														
7																														
8																														
9																														
10																														
11																														
12																														
13																														
14																														
15																														
16																														
17																														
18																														
19																														
20																														
21																														
22																														
23																														
24																														
25																														
TOTAL																														

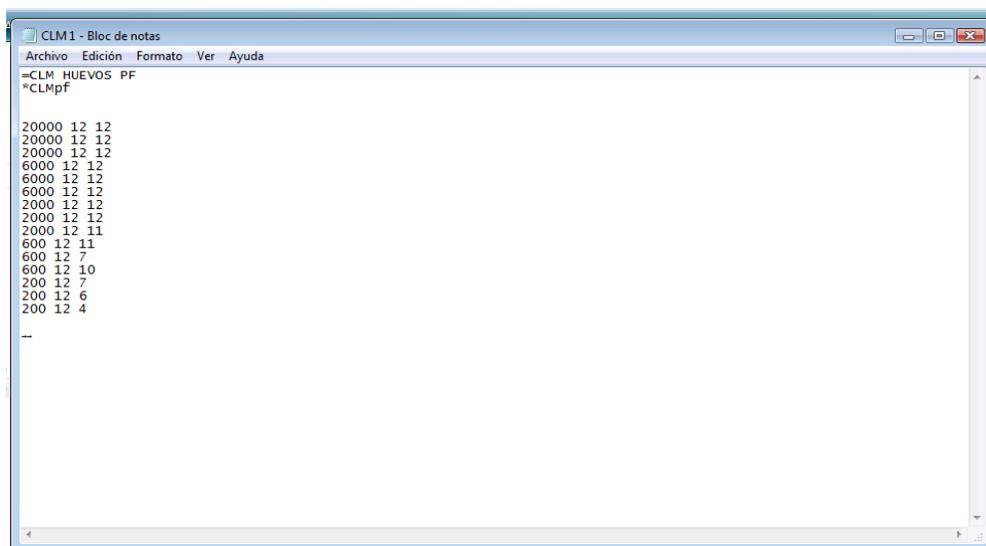
Estado: _____
 Dosis: _____
 Especie: _____
 Trietoma: _____
 Especie: _____
 Hongos: _____
 Inicio del bioensayo: _____
 Cambio a cajas de agar: _____
 Ag: _____

Levador: _____

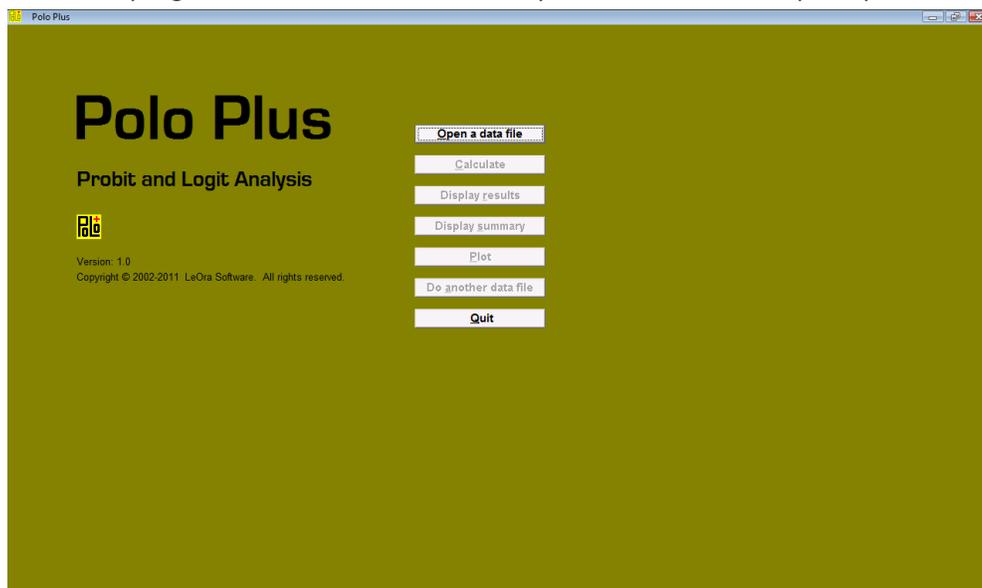
Observaciones: _____

Anexo 3. Determinación de la CL₅₀ con el programa estadístico Polo Plus®

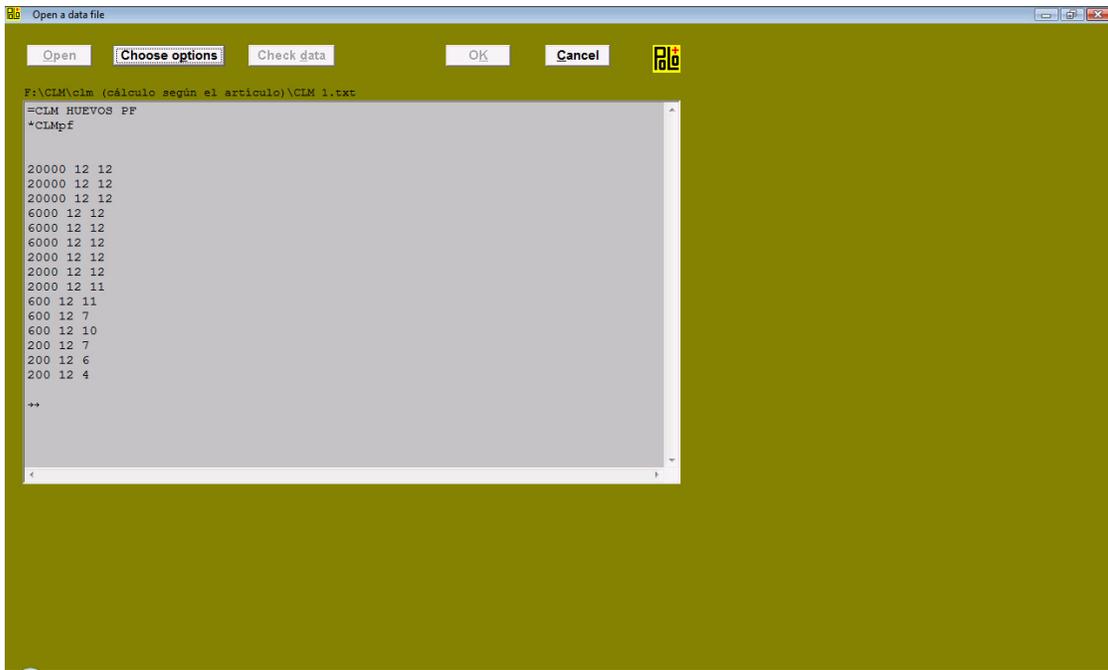
1. En un bloc de notas se anotan los resultados obtenidos para cada bioensayo. . En el símbolo = se anota el título que nos permita identificar el archivo, y el símbolo*se denomina línea de preparación para un conjunto de datos (solo ocho caracteres). Después en la primera columna se anotan las concentraciones utilizadas por cada bioensayo, en la segunda columna el total de individuos utilizados para cada bioensayo y en la tercer columna el número de individuos con respuesta o efecto a la concentración.



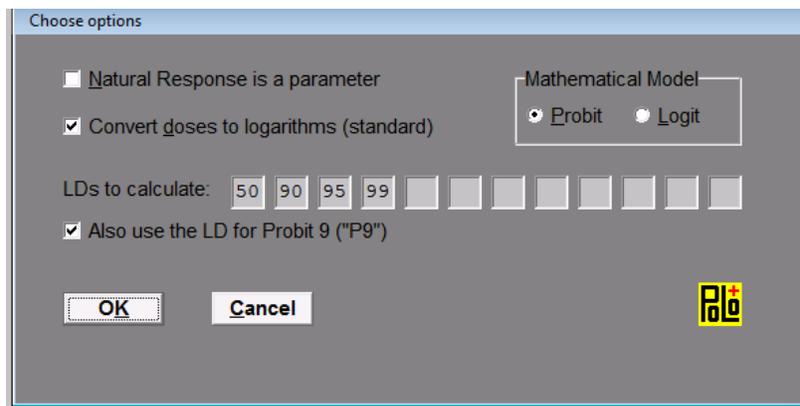
2. Se abre el programa estadístico Polo Plus[®] y se muestra el menú principal.



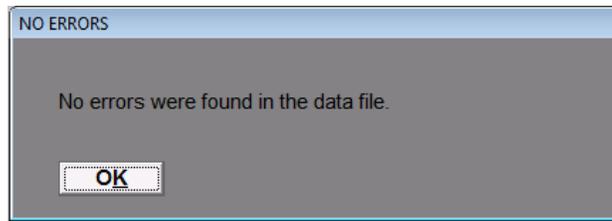
3. Se da clic en Open a data file, una vez abierto, se da clic en Open, lo cual abrirá el archivo de bloc de notas que hemos creado anteriormente.



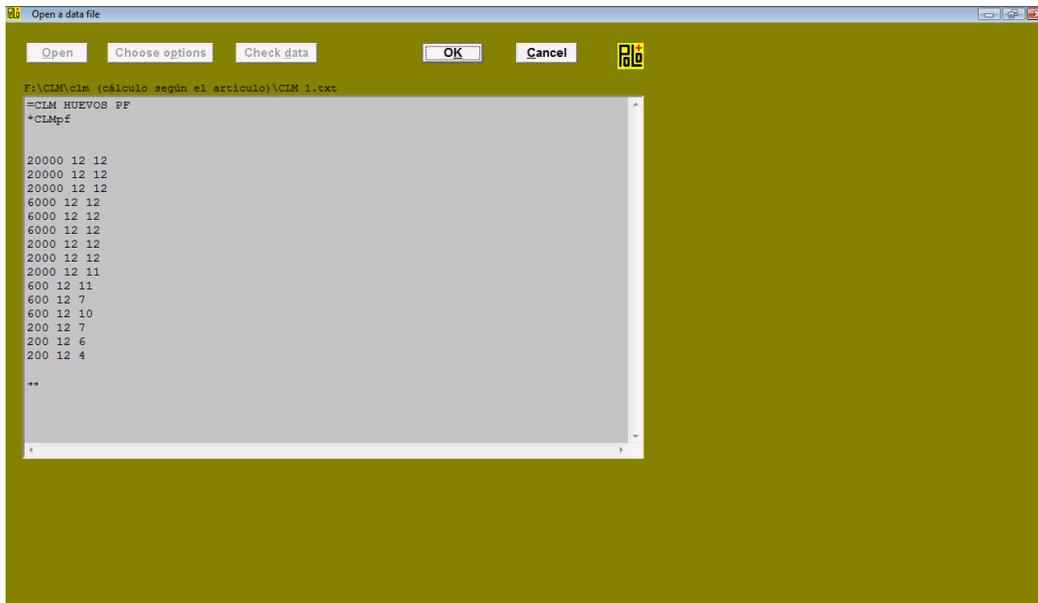
4. En Choose options aparecerá este cuadro de diálogo, verificar que únicamente las siguientes casillas estén seleccionadas se da clic en OK.



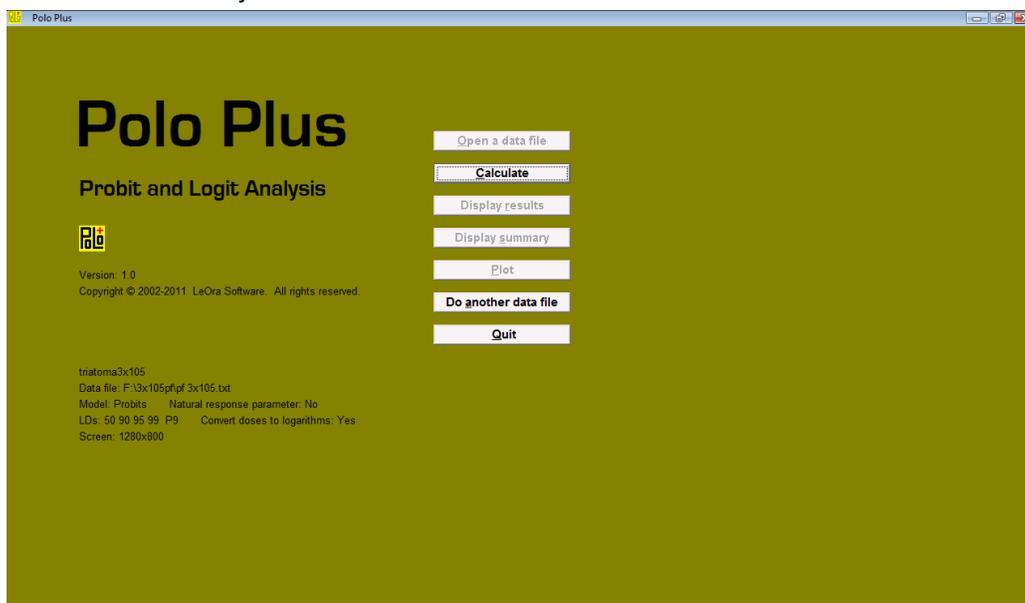
5. Se da click en Check data, para verificar que no existan errores en la base de datos. El programa envía el siguiente mensaje y se presiona OK:



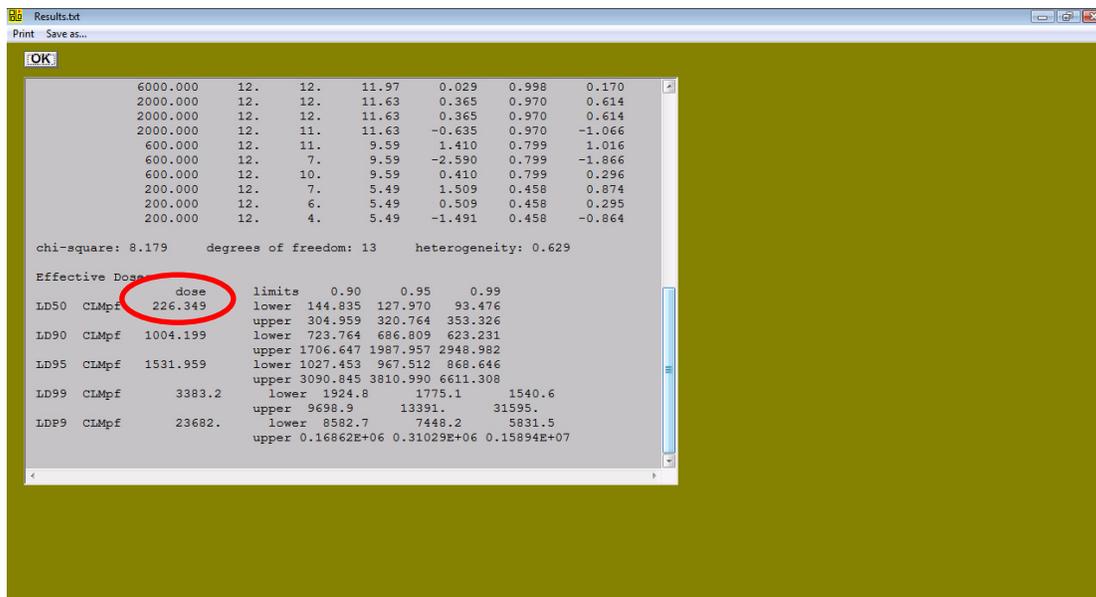
6. Regresando al menú principal únicamente la tecla OK se encuentra activa, se presiona:



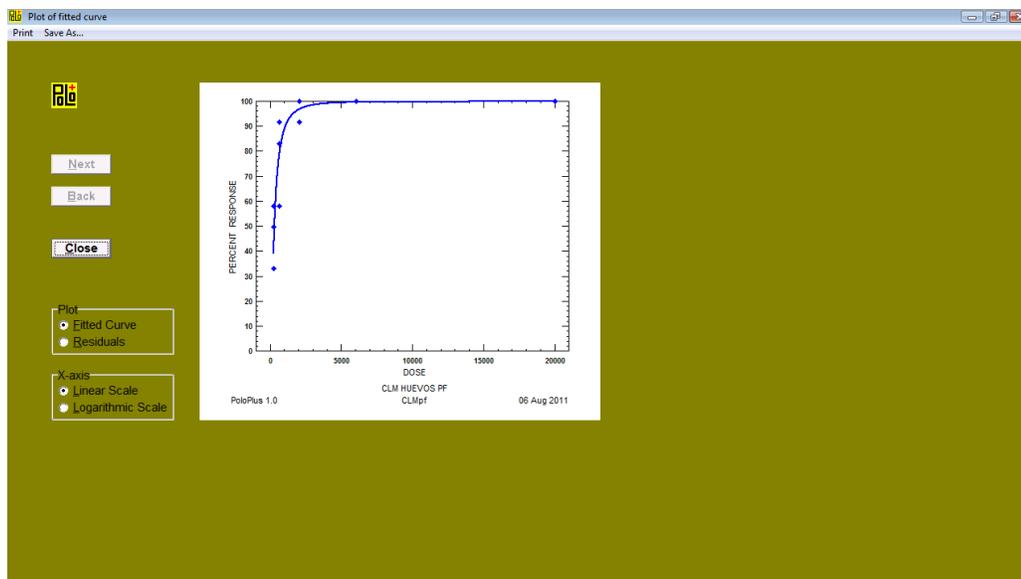
7. Y se regresa al menú principal donde presionaremos la tecla de Calculate, el programa enviará un mensaje de CRUNCHING.



8. Se presiona la tecla de Display results del menú principal, y el programa mostrará los siguientes resultados. El dato resaltado, es la CL_{50} , la cual se puede expresar exponencialmente para obtener la cantidad de conidios necesarios para matar al 50% de la población. Es posible obtener otras concentraciones como: CL_{90} , CL_{95} y CL_{99} .



- Se guarda el archivo en un bloc de notas presionando la tecla Save as, al finalizar se presiona la tecla OK, se regresa al menú principal y se presiona la tecla Plot para obtener el gráfico de concentración letal media, donde se grafica el porcentaje de mortalidad obtenido en cada concentración por cada bioensayo. Se guarda con Save as, cerramos el gráfico con la tecla Close, nos regresa al menú principal y si deseamos realizar otro análisis presionamos Do another file o si deseamos salir del programa la tecla Quit.



Anexo 4. Determinación del TL_{50} con el programa estadístico Polo Plus®

- En un bloc de notas se anotan los resultados obtenidos en los tres bioensayos. En la primer columna se anotan las horas o el tiempo en la que se realiza la observación, en la segunda columna el total de insectos utilizados y en la tercer columna el número de organismos que tuvieron respuesta.

```

pf 3x105 - Bloc de notas
Archivo Edición Formato Ver Ayuda

=triatoma3x105
*pf
36 75 1
48 75 7
60 75 41
72 75 48
84 75 61
96 75 64
108 75 68
120 75 68
132 75 68
144 75 68
156 75 69
168 75 69

--

```

- Se siguen los pasos del dos al siete mencionados para el cálculo de CL_{50} . Se presiona la tecla de Display results del menú principal, y el programa mostrará los siguientes resultados. El dato resaltado es el TL_{50} , el cual se puede dividir entre 24 para obtener el número total de días. Además es posible obtener otros tiempos como: TL_{90} , TL_{95} y TL_{99} .

```

Results.txt
Print Save as...

OK

60.000 75. 41. 30.78 10.221 0.410 2.399
72.000 75. 48. 42.40 5.601 0.565 1.305
84.000 75. 61. 51.73 9.270 0.690 2.314
96.000 75. 64. 58.71 5.294 0.783 1.482
108.000 75. 68. 63.71 4.290 0.849 1.385
120.000 75. 68. 67.21 0.786 0.896 0.298
132.000 75. 68. 69.64 -1.636 0.928 -0.733
144.000 75. 68. 71.30 -3.299 0.951 -1.758
156.000 75. 69. 72.44 -3.438 0.966 -2.185
168.000 75. 69. 73.22 -4.219 0.976 -3.199

chi-square: 50.182 degrees of freedom: 10 heterogeneity: 5.0182

Effective Doses
dose limits 0.90 0.95 0.99
LD50 pf 66.685 lower 58.388 56.205 50.618
upper 74.040 75.708 79.575
LD90 pf 121.205 lower 107.782 105.286 100.136
upper 142.692 149.877 172.265
LD95 pf 143.577 lower 124.913 121.639 115.113
upper 176.433 188.100 226.301
LD99 pf 197.277 lower 163.172 157.588 146.868
upper 265.236 291.485 384.474
LDP9 pf 430.526 lower 309.179 291.403 259.004
upper 734.380 873.083 1457.305

```

- Se guarda el archivo en un bloc de notas presionando la tecla Save as, al finalizar se presiona la tecla OK, se regresa al menú principal y se presiona la tecla Plot para obtener el gráfico de mortalidad acumulada. Se guarda con Save as, cerramos el gráfico con la tecla Close, nos regresa al menú principal y si deseamos realizar otro análisis presionamos Do another file o si deseamos salir del programa la tecla Quit.