



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS

***Isaria fumosorosea* Y *Metarhizium anisopliae* PARA EL CONTROL
BIOLÓGICO DE *Meccus pallidipennis* Y SU DETECCIÓN MOLECULAR EN
INSECTOS INFECTADOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RODRÍGUEZ PÉREZ ANA CECILIA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

M. EN C. MARGARITA CABRERA BRAVO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 22 de junio de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **RODRÍGUEZ PÉREZ ANA CECILIA** con número de cuenta 301111652, con la tesis titulada "*Isaria fumosorosea* Y *Metarhizium anisopliae* PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Meccus pallidipennis* Y SU DETECCIÓN MOLECULAR EN INSECTOS INFECTADOS", realizada bajo la dirección de la **DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA**:

Presidente: DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR
Vocal: DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO
Secretario: M. EN C. MARGARITA CABRERA BRAVO
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO
Suplente: DRA. MARIA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 07 de octubre de 2015

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A CONACYT y al programa de becas, por el apoyo recibido con el número de CVU: 480422 / Becario 280532.

Al Programa DGAPA-PAPIIT por el financiamiento al proyecto IT-202012.

A mi Tutora principal, Dra. Concepción Toriello Nájera.

A los miembros del comité Tutor: Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor y Dra. Margarita Cabrera Bravo.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A la Dra. Concepción Toriello Nájera, por todas sus enseñanzas compartidas en la elaboración de esta tesis.

A los miembros del jurado: Dr. Alejandro Córdoba Aguilar, Dr. Joaquín Cifuentes, Dra. María del Carmen Leticia Calderón, Dra. Maria Lucia Taylor Da Cuhna e Mello Ezquerro y Dra. Margarita Cabrera Bravo, por la revisión de esta tesis.

A la M. en C. Hortensia Navarro Barranco, Técnica Académica adscrita al Laboratorio de Micología Básica, Facultad de Medicina, UNAM; por la enseñanza en las técnicas de preparación de los hongos entomopatógenos y las infecciones realizadas en los triatóminos.

A la Doctorante Carolina Brunner Mendoza, adscrita al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por todas sus enseñanzas en la extracción de DNA, estandarización de la técnica de PCR para las sondas de DNA empleadas en este trabajo.

A la Dra. Margarita Cabrera Bravo, por la revisión de esta tesis, ser parte del comité tutorial y jurado, así como la ayuda en el trabajo de campo realizado en Anenecuilco Morelos.

A la Dra. Paz María Salazar-Schettino, por dar las facilidades para la obtención de los triatóminos empleados en este trabajo.

Al Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por su apoyo en las aspersiones del hongo en la comunidad seleccionada.

A los Biólogos (Facultad de Ciencias, UNAM) Andrés Medrano García, Berenice Jiménez Santiago y Lidio Gutiérrez Ocampo; por su apoyo en el trabajo de campo y el laboratorio (recolección de datos, aspersión de las casas seleccionadas y recolecta de triatóminos posterior a la aspersión e infección de triatóminos).

DEDICATORIA

A mi madre, gracias por ser parte de mi vida, guiarme y apoyarme en cada paso que he dado. Sin ti no habría podido lograr esto, te amo madre.

A mis hermanos y en especial a Marta, gracias por tus consejos y por estar a mi lado, te quiero muchísimo hermana.

A Miguel Ángel Blanco Becerril, por darme la oportunidad de conocer a esa persona tan maravillosa que fuiste, por tu gran corazón y esa alegría depositada en cada una de las cosas que realizaste, nunca olvidaré tus enseñanzas y todos los momentos que vivimos juntos.

A mis mejores amigos, Javo González, Xcittalli González, Miguel Espinoza, Andrés Reséndiz, Andrés García, Triny Urtiz, Ileana Gayosso, Carolina Brunner, Karla Rubio, Sara Ceccarelli, Ignacio ferro, y todos aquellos que olvido mencionar, gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos, por las sonrisas compartidas y por el apoyo que he recibido de cada uno de ustedes; me siento bendecida por tenerlos a mi lado.

*Una tarde, hace muchísimo tiempo,
Dios convocó a una reunión.
Estaba invitado un ejemplar de cada especie.
Una vez reunidos, y después de
escuchar muchas quejas, Dios soltó
una sencilla pregunta: "¿Entonces, qué te gustaría ser?"
a la que cada uno respondió sin tapujos y a corazón abierto:
La jirafa dijo que le gustaría ser un oso panda.
El elefante pidió ser mosquito.
El águila, serpiente.
La liebre quiso ser tortuga, y la tortuga, golondrina.
El león rogó ser gato.
La nutria, carpincho
El caballo, orquídea.
Y la ballena solicitó permiso para ser zorzal...
Le llegó el turno al hombre, quien casualmente venía de recorrer el camino de
la verdad, hizo una pausa, y esclarecido exclamó:
"Señor, yo quisiera ser... feliz."*

Viví García, Me gustaría ser

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	I
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. OBJETIVOS	17
3. ANTECEDENTES	18
4. MÉTODOS.....	21
5. RESULTADOS	41
6. DISCUSIÓN	60
7. CONCLUSIONES.....	64
8. EXPECTATIVAS	64
9. REFERENCIAS	66
10. ANEXO 1: RELACIÓN DE TRIATÓMINOS RECOLECTADOS EN ANENECUILCO, MORELOS	76

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Datos de las cepas estudiadas _____	21
Tabla 2. Mortalidad acumulada de ninfas N2, N3 y N4 de <i>Meccus pallidipennis</i> infectadas con <i>Isaria fumosorosea</i> _____	43
Tabla 3. Valores de TL50 y TL90 de <i>Isaria fumosorosea</i> en N2, N3 y N4 de <i>Meccus pallidipennis</i> _____	45
Tabla 4. Mortalidad acumulada en N2, N3 y N4 de <i>Meccus pallidipennis</i> infectados con <i>Metarhizium anisopliae</i> (EH-473/4) _____	47
Tabla 5. Mortalidad acumulada en N2, N3 y N4 de <i>Meccus pallidipennis</i> infectados con <i>Metarhizium anisopliae</i> (EH-473/4) _____	49

FIGURAS

Figura 1. Estructura de la cutícula del insecto y modo de penetración del hongo _____	6
Figura 2. <i>Isaria fumosorosea</i> _____	9
Figura 3. <i>Metarhizium anisopliae</i> _____	11
Figura 4. Representación esquemática del ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> _____	14
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Meccus pallidipennis</i> _____	15
Figura 6. Diagrama experimental _____	20
Figura 7. Mapa del estado de Morelos con acercamiento a la localidad de Anenecuilco, municipio de Ayala. Copiado y modificado de INEGI y Google Maps _____	31
Figura 8. Cronograma de actividades realizadas en la localidad de Anenecuilco, Morelos _____	32
Figura 9. Mapa de las zonas seleccionadas para el estudio en Anenecuilco, Morelos _____	34
Figura 10. Colocación de trampa atrayente de triatóminos en el peridomicilio de una vivienda _____	36
Figura 11. Preparación de equipo y formulación para asperjar _____	36
Figura 12. Aplicación de <i>M. anisopliae</i> en la periferia de una vivienda en la zona sur de la comunidad seleccionada para el estudio _____	37
Figura 13. Aplicación de Tween y agua sin hongo en una vivienda testigo _____	37
Figura 14. Diseño de las trampas cebadas para la etapa 4 en campo _____	39
Figura 15. Infección de ninfas de <i>Meccus pallidipennis</i> por <i>Isaria fumosorosea</i> EH-511/3 _____	42
Figura 16. Mortalidad acumulada de N2 de <i>Meccus pallidipennis</i> infectadas con 1×10^7 conidios/mL de <i>Isaria fumosorosea</i> _____	44

Figura 17. Mortalidad acumulada de N3 de <i>Meccus pallidipennis</i> infectadas con 1×10^7 conidios/mL de <i>Isaria fumosorosea</i> _____	44
Figura 18. Mortalidad acumulada de N4 de <i>Meccus pallidipennis</i> infectadas con 1×10^7 conidios/mL de <i>Isaria fumosorosea</i> _____	45
Figura 19. Infección de ninfas de <i>Meccus pallidipennis</i> por <i>Metarhizium anisopliae</i> EH-473/4 ____	46
Figura 20. Mortalidad acumulada de N2 de <i>Meccus pallidipennis</i> infectadas con 1×10^7 conidios/mL de <i>Metarhizium anisopliae</i> _____	48
Figura 21. Mortalidad acumulada de N3 de <i>Meccus pallidipennis</i> infectadas con 1×10^7 conidios/mL de <i>Metarhizium anisopliae</i> _____	48
Figura 22. Mortalidad acumulada de N4 de <i>Meccus pallidipennis</i> infectadas con 1×10^7 conidios/mL de <i>Metarhizium anisopliae</i> _____	48
Figura 23. . Efecto de <i>Isaria fumosorosea</i> en ninfas N2, N3 y N4 de <i>Meccus pallidipennis</i> a los 5 y 6 días posteriores a la infección _____	49
Figura 24. Efecto de <i>Metarhizium anisopliae</i> en ninfas N2, N3 y N4 de <i>Meccus pallidipennis</i> a los 5 y 6 días posteriores a la infección _____	50
Figura 25. Análisis del porcentaje de mortalidad de <i>M. pallidipennis</i> N2, N3 y N4 por la infección con <i>Isaria fumosorosea</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> al quinto día _____	51
Figura 26. Análisis del porcentaje de mortalidad acumulada de <i>M. pallidipennis</i> N2, N3 y N4 por la infección con <i>I. fumosorosea</i> y <i>M. anisopliae</i> al sexto día de la infección _____	52
Figura 27. Especificidad de la sonda de DNA de <i>I. fumosorosea</i> _____	53
Figura 28. Especificidad de la sonda de DNA de <i>M. anisopliae</i> _____	54
Figura 29. Identificación de <i>M. anisopliae</i> en la infección de ninfas N5 de <i>M. pallidipennis</i> en las trampas cebadas del laboratorio _____	55
Figura 30. Identificación de cepas silvestres de <i>I. fumosorosea</i> en triatóminos de <i>M. pallidipennis</i> recolectados antes de la aplicación del hongo en Anenecuilco, Morelos _____	56
Figura 31. Identificación de cepas silvestres de <i>M. anisopliae</i> en triatóminos de <i>M. pallidipennis</i> recolectados antes de la aplicación del hongo en Anenecuilco, Morelos _____	56
Figura 32. Identificación de <i>Metarhizium anisopliae</i> en triatóminos de <i>M. pallidipennis</i> recolectados después de la primera aspersion del hongo (a la semana y al mes de la aplicación) _____	57
Figura 33. Identificación de <i>Metarhizium anisopliae</i> en triatóminos de <i>M. pallidipennis</i> recolectados después de la segunda aspersion del hongo (a la semana y al mes de la aplicación) _____	58
Figura 34. Crecimiento fúngico de <i>Metarhizium anisopliae</i> en una hembra de <i>Meccus pallidipennis</i> , sembrados en agar-agua a los 15 días de la recolecta. _____	59
Figura 35. Identificación de <i>Metarhizium anisopliae</i> en triatóminos de <i>M. pallidipennis</i> recolectados a los siete días de la colocación de las trampas cebadas _____	59

RESUMEN

Los insecticidas químicos han tenido un impacto negativo en el ambiente y en la salud humana. Lo anterior sumado a la resistencia desarrollada por los insectos a los químicos ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas con base biológica para el control de insectos. Los hongos entomopatógenos han sido utilizados como micoinsecticidas; entre ellos, *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae* destacan como bioinsecticidas para plagas agrícolas de interés económico y también para el control de vectores en sitios donde las enfermedades transmitidas por estos insectos son un problema de salud. Un ejemplo es la enfermedad de Chagas en Latinoamérica, la cual es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Diversas especies de chinches de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) actúan como vectores. México es uno de los países con el mayor número de especies de triatóminos; se han reconocido 32 de las cuales 13 son consideradas importantes vectores de *T. cruzi*; destacan como géneros importantes *Triatoma* y *Meccus*, que presentan el mayor índice de transmisión del parásito a humanos en el país. *Meccus pallidipennis* es importante desde el punto de vista epidemiológico, debido a su amplia distribución geográfica, ya que está presente en 13 estados de la República Mexicana y se ubica de forma predominante en el peridomicilio. En este trabajo se seleccionaron dos cepas de hongos, *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* (estudiados con antelación fenotípicamente y genotípicamente) para investigarlos como agentes microbianos para el control biológico del insecto transmisor de *T. cruzi*. Para determinar cuál de estos hongos era el más virulento para el insecto transmisor *M. pallidipennis*, se estudió su virulencia en los estadios ninfales N2, N3 y N4, provenientes de una colonia de insectos mantenida en el laboratorio. Se utilizaron 75 ninfas por cada estadio (25 con tres repeticiones cada una) y 25 testigos. La dosis fúngica empleada fue de 1×10^7 conidios/ mL aplicando 30 μ L en el pronoto de cada ninfa. La supervivencia y mortalidad de los insectos se registraron diariamente para determinar el Tiempo Letal Medio (TL50), mediante el análisis Probit (Polo Plus Versión 1.0). El hongo *M. anisopliae* fue el más virulento en los 3 estadios ninfales. Debido a estos resultados, se eligió el hongo *M.*

anisopliae para los estudios de campo. Se seleccionó la localidad de Anenecuilco, Morelos donde se identificaron triatóminos infectados con *T. cruzi*. Se utilizó una sonda molecular específica para cada uno de los hongos, obtenida en trabajos previos, la cual no detectó la presencia de cepas silvestres de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* en insectos recolectados. Se realizaron 3 aplicaciones experimentales de *M. anisopliae* en el peridomicilio de 24 viviendas seleccionadas. Después de las aplicaciones, se recolectaron insectos, en los cuales se realizó la detección molecular del hongo con la sonda de DNA de *M. anisopliae*, corroborando que los triatóminos se infectaron exitosamente con la aplicación del micoinsectida. Este trabajo demostró que *M. anisopliae* presentó mayor virulencia que *I. fumosorosea* para *M. pallidipennis*, por lo que este hongo se perfila como un buen candidato para el control biológico de *M. pallidipennis* en el país.

ABSTRACT

The negative impact chemical insecticides have had on the environment and human health, along with resistance to chemicals developed by insects, have motivated the search for new biologically-based alternatives for controlling insects. Thus, entomopathogenic fungi have been utilized as mycoinsecticides, including *Isaria fumosorosea* and *Metarhizium anisopliae*, both used as bioinsecticides against agricultural pests of particular economic importance, as well as for controlling vectors in those areas where insect-borne diseases are a health problem; such as Chagas disease in Latin America —caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*. Several species of bedbugs from the Triatominae subfamily (Hemiptera: Reduviidae) act as vectors. Mexico is among those countries with the highest count of members of this species; 13 out of 32 identified species are considered to be important vectors of *T. cruzi*, among which *Triatoma* and *Meccus* stand out as important genera, with the highest transmission rate of the parasite to humans in the country. Furthermore, from an epidemiological perspective, *Meccus pallidipennis* is also deemed important due to its widespread geographical distribution, since it can be found in 13 states of Mexico and it is predominantly located around the dwellings or in their peridomiciliar area. In this study, two strains of fungi were selected, *I. fumosorosea* and *M. anisopliae* (whose genotype-phenotype assessment was conducted beforehand) to study their role as microbial agents for the biological control of the insect transmitter of *T. cruzi*. In order to determine which of these fungi was the most virulent for the *M. pallidipennis* insect transmitter, their virulence was studied in N2, N3 and N4 instars, obtained from an insect colony kept in the laboratory. Seventy-five nymphs were used in each stage (thrice for every group of 25 nymphs) plus 25 as controls. A 1×10^7 conidia/mL fungal dose was given, applying 30 μ L in each nymph pronotum. Insect survival and mortality were recorded daily to determine mean Lethal Time (LT50), using the Probit analysis (Polo Plus Version 1.0). *M. anisopliae* was the most virulent of the fungi in all 3 instars. Due to these results, *M. anisopliae* was the fungus selected for use in field studies. Anenecuilco, in the state of Morelos, was the chosen location, since infected triatomines with *T. cruzi* were found. A molecular probe specific to each fungus —

obtained in previous studies— was used, but it did not detect the presence of wild strains of *M. anisopliae* or *I. fumosorosea* in the insects collected from the selected location. Three experimental applications of *M. anisopliae* were conducted in the peridomiciliar area surrounding the 24 selected households. Following these applications, a molecular detection of the fungus —using the DNA probe of *M. anisopliae*— was performed in the insects collected, confirming the successful infection of triatomine after applying the mycoinsecticide. In brief, in this study we proved that *M. anisopliae* presented a higher degree of virulence for *M. pallidipennis* than *I. fumosorosea*; a fact that makes it a good candidate as a fungal biological control agent of the *M. pallidipennis* species in the country.

1. INTRODUCCIÓN

Los insecticidas químicos han sido cruciales en el control de vectores de enfermedades como lo son los mosquitos, piojos, pulgas, moscas tse-tsé, triatóminos entre otros (Hemingway y Ranson, 2000). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que el uso de insecticidas sintéticos reducen drásticamente el riesgo de infección de diversas enfermedades transmitidas por insectos (WHO, 2006; Brengues *et al.*, 2003). Sin embargo, los insecticidas químicos han tenido un impacto negativo en el ambiente y en la salud humana; además de que los insectos crean resistencia ante ellos (Inglis y Tigano, 2006). Este grave problema ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas con base biológica para el control de insectos.

Los agentes de control microbiano para el manejo integrado de plagas (MIP), surgen como una alternativa al uso de los insecticidas químicos. Patógenos tales como virus, bacterias, hongos, protozoarios y nemátodos, son comúnmente aislados de insectos u otros hospederos invertebrados y utilizados como agentes de control biológico. Su presencia de forma natural en poblaciones de invertebrados contribuyen a la regulación de plagas perjudiciales para humanos, las cuales pueden afectar cultivos, hogares y animales domésticos (Lacey y Kaya 2007).

Los insectos pueden ser infectados por diversos microorganismos patógenos; pero son quizás los hongos, los más adecuados para efectuar las infecciones, ya que no requieren ingestión por parte del hospedero (Thomas y Read, 2007). La infección se lleva a cabo a través del exoesqueleto o cutícula, por lo que también pueden infectar estadios que no se alimentan como lo son los huevos y pupas (Hajek y Leger, 1994).

Actualmente se encuentran en el mercado, diversas marcas comerciales de agentes de control microbiano que tienen como ingrediente activo, esporas de diversos hongos. Entre ellos, Biogen producido en Brasil utilizando *Metarhizium anisopliae* para el control del salivazo de los pastos (Hemiptera); Mycotrol generado en Estados Unidos emplea *Beauveria bassiana* para el control de diversos insectos; Green Muscle desarrollado entre varios países europeos y Benin (África) con

Metarhizium acridum para el control biológico de grillos y langostas (Orthoptera) (Butt *et al.*, 2001).

Mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos

El mecanismo de infección es similar en todos los HE y comienza con el contacto directo de la espora con la cutícula del hospedero, siendo la cutícula la primera barrera ante la penetración (Napolitano y Juárez 1997). El proceso de infección comienza con la adhesión de la espora a la cutícula mediante proteínas específicas, la germinación y crecimiento del tubo germinativo que busca sitios adecuados para la penetración a través de la cutícula, la formación del apresorio o clavija de penetración; la penetración de las capas del exoesqueleto que combina fuerzas físicas y degradación enzimática; la diseminación del hongo en el hemocele, músculos y otros tejidos del hospedero mediante la formación de cuerpos hifales o blastosporas que ayudan a colapsar el sistema inmune del hospedero; y por último, el manejo del cadáver para optimizar la producción de nuevos conidios y dispersarlos bajo condiciones ambientales óptimas (Boucias y Pendland, 1998; Boomsma *et al.*, 2014) (Fig. 1a y b).

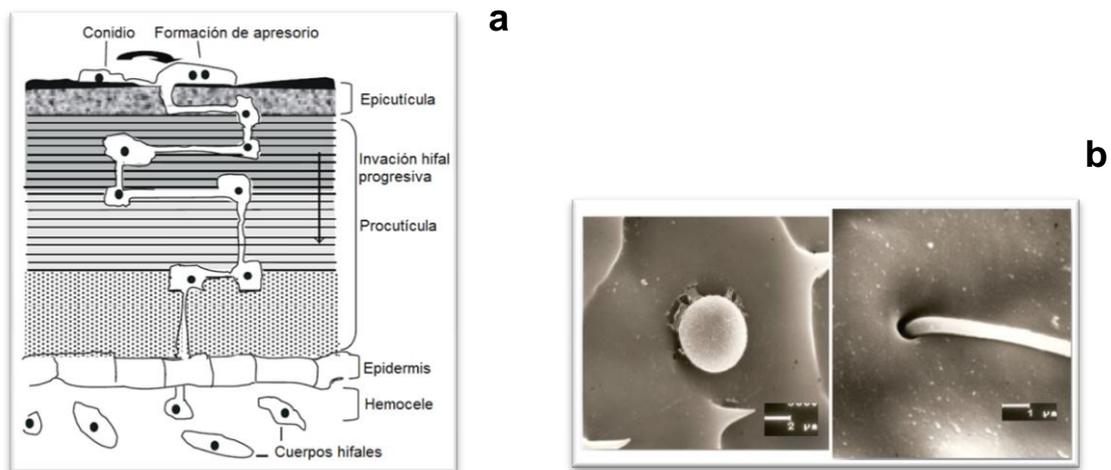


Figura 1. Estructura de la cutícula del insecto y modo de penetración del hongo. a) Esquema de penetración en un insecto, modificado de Clarkson y Charnley (1996). (b) Adhesión de un conidio de *Metarhizium acridum* y penetración de la hifa en un espiráculo de langosta (*Schistocerca piceifrons piceifrons*) (Toriello y Pérez-Torres, comunicación personal).

Cada proceso en la infección del insecto está influenciado por un rango de factores intrínsecos y extrínsecos que determinan la patogenicidad del hongo (Shahid *et al.*, 2012).

Las esporas asexuales o conidios son la forma infectiva del hongo, éstas son dispersadas en el ambiente donde el hospedero está presente (Samson *et al.*, 1988). La unión del conidio a la superficie de la cutícula de insecto es el evento inicial para el establecimiento de la micosis, y se lleva a cabo cuando el conidio hidrófobo entra en contacto con la cutícula del hospedero; la presencia de “rodlets” en los conidios inducen fuerzas hidrofóbicas no específicas para que se lleve a cabo la unión (Boucias y Pendland, 1998).

Cuando los conidios se adhieren a la superficie del insecto, se da una rápida germinación y crecimiento del hongo, lo cual está profundamente influenciado por la disponibilidad de agua, nutrientes, oxígeno, pH, temperatura y efectos de los componentes de superficie del hospedero (Sandhu, 1995). La presencia de una variedad de enzimas hidrolíticas como, proteasas, quitinasas y lipasas, promueve la germinación y crecimiento del hongo en la superficie del insecto y la subsecuente degradación y penetración de las capas cuticulares (Xiao *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2011).

Después de la formación del tubo germinativo éste ejerce una presión sobre la cutícula del insecto que termina con la formación de un apresorio y es mediante ésta estructura que se lleva a cabo la penetración de la cutícula. (Sandhu, 1995). La penetración de las capas de la cutícula y el comienzo de la invasión al hospedero por parte del hongo se acompaña de varias actividades de respuesta, un ejemplo de esto es la producción de fenoloxidasas, la formación de hemocitos y un proceso de melanización por parte del insecto (Vilcinskas y Götz, 1999).

Con la penetración exitosa del hongo, éste comienza a producir blastosporas o cuerpos hifales, los cuales se distribuyen pasivamente por el hemocele a través del sistema circulatorio del insecto (Bhattachary *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009). A medida que el hongo invade el cuerpo del hospedero, se da un agotamiento de nutrientes y comienza la producción de hifas y conidios en la superficie del hospedero (Bidochka y

Melzer 2000). La muerte del hospedero combina factores como invasión de tejidos, agotamiento de nutrientes y la producción de toxinas (Sandhu *et al.*, 2012).

Las toxinas o metabolitos secundarios producidos por el hongo juegan un papel importante en la disminución de las defensas del sistema inmune del hospedero; dañan el sistema muscular y los tubos de Malpighi afectando la excreción, movilidad y alimentación del insecto (Pal *et al.*, 2007).

Los HE han sido ampliamente utilizados para controlar diversas plagas de interés agrícola pero también se han empleado en el control de insectos parásitos y transmisores de enfermedades como la malaria (transmitido por *Anopheles*), virus del ganado (transmitido por *Culicoides*), la mosca *Haematobia irritans* que es un ectoparásito de bovinos e incluso la enfermedad de Chagas (Tomas y Read, 2007; Mochi *et al.*, 2010; Ansari *et al.*, 2011). Las especies de los géneros *Metarhizium* y *Beauveria* son los HE más utilizados por su facilidad de producción en masa, almacenamiento, virulencia y facilidad de aplicación (Choo y Rice, 2007). Pero existen muchos otros, entre ellos, *Isaria* (\equiv *Paecilomyces*), *Lecanicillium* y *Aschersonia* que también son utilizados con el mismo fin.

Se han realizado diversos estudios de bioseguridad en cepas mexicanas de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae*, de los cuales se ha concluido que pueden utilizarse como bioinsecticidas, debido a que son inocuos en mamíferos con relación a su patogenicidad y toxicidad en modelos murinos, por lo que presentan un bajo riesgo a la salud humana al ser aplicados como control de plagas (Toriello *et al.*, 2006, 2008; Mier *et al.*, 2005).

Según la clasificación de Sung *et al.* (2007) los HE se concentran en tres clados mayores que son: Entomophthoromycota, Onygenales e Hypocreales. Los Hypocreales a su vez se dividen en tres familias de las cuales, Cordycipitaceae contiene al género *Isaria* y Clavicipitaceae al género *Metarhizium*.

Generalidades de *Isaria fumosorosea*

La primera descripción de *Isaria fumosorosea* (\equiv *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize), Brown & Smith) (Ascomycota: Cordycipitaceae: Hypocreales) se publicó en 1832 por Fries y 1904 por Wize, respectivamente. Se aisló por primera vez del coleóptero *Cleonus punctiventris* de la remolacha azucarera. Es un hongo de rápido crecimiento con colonias que inicialmente son blancas y luego se tornan rosas grisáceas; las fiálides tienen forma de botella con una porción basal globosa o elipsoide y los conidios son cilíndricos a fusiformes, hialinos a ligeramente rosáceos que van de 3-4 x 1-2 μm (Zimmermann, 2008) (Fig. 2).

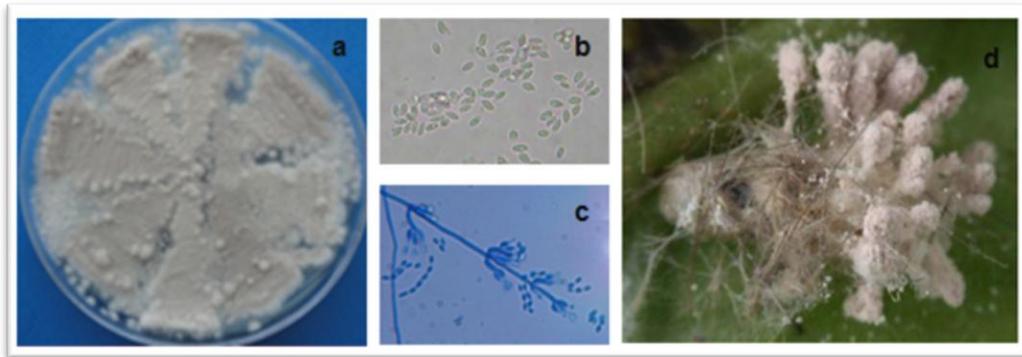


Figura 2. *Isaria fumosorosea*. a) Aspecto macroscópico de la colonia en medio de agar papa peptona; b) Conidios fusiformes 400 x; c) Microscopía de fiálides y conidios con tinción de azul de algodón; d) Mosquita blanca (Hemiptera: *Aleyrodidae*) infectada con el hongo, obtenida de Revised Reference of Entomopathogenic Fungi, Johji Aoki, 2003.

I. fumosorosea puede encontrar alrededor del mundo, desde zonas tropicales hasta templadas y tiene un amplio rango de hospederos. Se ha aislado de diversos artrópodos como son Lepidoptera, Acari, Araneae, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera (Greif y Currah, 2007), pero también se ha encontrado en el aire, agua, plantas y en suelo (Zimmermann, 2008).

Se comercializa como bioinsecticida principalmente en Estados Unidos y Europa, donde se han desarrollado productos con base en este hongo sólo o en combinación con otras especies (Jackson *et al.*, 1985; Bolckmans *et al.*, 1995) y se

emplea como agente de control biológico en invernaderos y en campo principalmente (Wraight *et al.*, 2000).

El hongo *I. fumosorosea* se ha empleado eficientemente por más de 15 años para el control biológico de mosquita blanca Aleyrodidae *spp.* y de otros hemípteros como Aphididae, Delphacidae, Psyllidae Cicadellidae, e incluso en Triatominae con resultados prometedores (Saphiro-Ilan *et al.*, 2008; Toledo, *et al.*, 2007; Stauderman *et al.*, 2012; Hunter *et al.*, 2011; Rocha y Luz, 2011).

La eficacia de éste hongo al igual que otros, depende de diversos factores bióticos y abióticos. La temperatura, humedad relativa (HR), incluyendo el agua y la radiación solar son los factores abióticos más importantes que afectan de manera directa la germinación, crecimiento vegetativo y viabilidad del hongo (Vidal y Fargues, 2007). Generalmente, *I. fumosorosea* requiere temperaturas entre 20-30°C para su crecimiento óptimo y sus conidios son altamente susceptibles a la radiación solar, incluso mucho más que los conidios de *M. anisopliae* y *B. bassiana*. Los factores bióticos que pueden limitar la estabilidad y actividad insecticida de *I. fumosorosea* son las cepas del hongo con virulencia elevada, los insectos blanco y los propágulos empleados en la infección de los insectos (blastosporas vs conidios) (Zimmermann, 2008).

I. fumosorosea al igual que otros HE produce toxinas durante el proceso de infección, que ayudan a sedar o matar al hospedero y facilitan la adquisición de recursos fúngicos. Las toxinas con actividad insecticida que se han descrito en éste hongo son la beauvericina, el ácido piridina-2, 6-dicarboxílico y el ácido dipicolínico (Zimmermann, 2007a).

Generalidades de *Metarhizium anisopliae*

El género es definido con base en el arreglo de las fiálides, en forma de columnas, simples o ramificados y apicalmente puntiagudos con conidios basípetos y catenulados (Zimmermann, 2007); las colonias son blanquecinas o amarillentas y después toman tonalidades verde olivo (Fig. 3). Los primeros estudios de *M.*

anisopliae en el control biológico fueron realizados por Metschnikoff (1879) al observar el hongo sobre larvas de *Anisoplia austriaca* infectando trigo, proponiendo así el nombre de *Entomophthora anisopliae*. Tiempo después Steinhaus (1949) y Müller-Kögler (1965) lo describen a detalle.

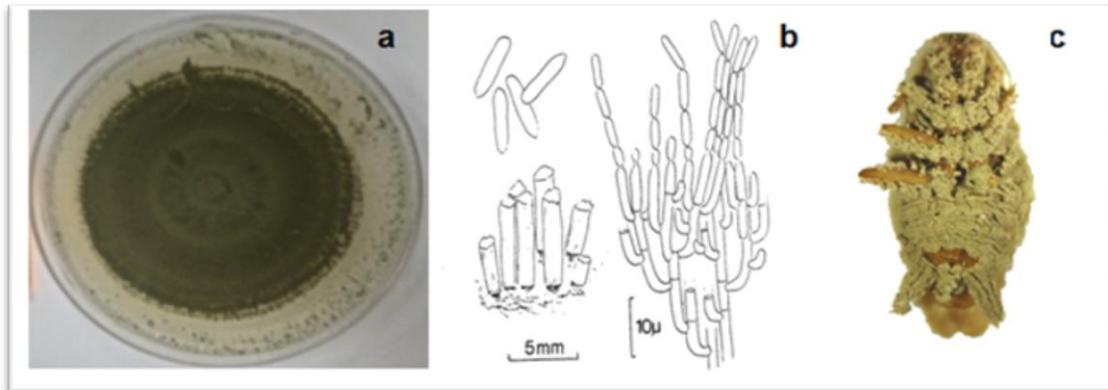


Figura 3. *Metarhizium anisopliae*. a) Cultivo monospórico de EH-473/4 a 10 días de siembra en medio de cultivo de APD. b) Esquema de morfología del conidióforo, fiálides, conidios y columnas de conidios (Watanabe, 1994; Barron, 1983). c) Infección en cucaracha (Blattodea) obtenido de Chengshu *et al.*, 2010.

Debido a que *M. anisopliae* tiene una amplia gama de hospederos, ha sido utilizado por más de 130 años como agente de control biológico. Hoy en día es uno de los más importantes hongos empleados en diversas plagas de insectos, como termitas, langostas, cucarachas, hemípteros, plagas que habitan el suelo como escarabajos y curculiónidos; transmisores de enfermedades como lo son mosquitos, chinches, ácaros, garrapatas, entre otros. Se ha comercializado alrededor del mundo bajo diferentes marcas como Bio Blast, Bio Path (USA), Bio-Green Granules (Australia), Green Muscle (UK/France); entre muchas otras marcas comerciales. Su distribución es mundial desde el ártico a los trópicos, se puede encontrar en el suelo y en una amplia gama de hospederos (Butt *et al.*, 2001; Zimmermann, 2007).

En *M. anisopliae* podemos encontrar una gran variedad de productos del metabolismo secundario (toxinas) como son destruxinas, citocalasinas y swainsoninas que están implicados en la patogenicidad, incrementando la infección y la colonización del hospedero o como antibióticos para suprimir a otros microorganismos del mismo hábitat y así aumentar su supervivencia (Vey *et al.*, 2001).

Los factores ambientales que influyen de manera directa en *M. anisopliae* son determinantes para el desarrollo de una exitosa estrategia de biocontrol y la persistencia del mismo en el ambiente. La germinación y crecimiento óptimo del hongo se presenta entre 15 y 35°C (Milner *et al.*, 2003; Toriello *et al.*, 2008) con algunas diferencias en la germinación y crecimiento entre aislados según la temperatura (Dimbi *et al.*, 2004). Generalmente se necesita una HR alta para la germinación de *M. anisopliae*, pero también se ha visto que germina cuando se tiene una HR del 92.5% y no germina cuando la HR es de 85% (Walstad *et al.*, 1970). Aunque la HR parece un factor determinante, en bioensayos con termitas se observó una germinación con una HR de 86%, por lo que la humedad no parece afectar la patogenicidad (Zimmermann, 2007).

La radiación solar es clave en la eficacia del hongo en el campo, afecta directamente la sobrevivencia y juega un importante papel en la seguridad con respecto a los residuos del hongo en los sitios tratados. En general, se ha demostrado que la radiación ultravioleta-B (280-320nm) y la radiación ultravioleta-A (320-400nm) causan la inactivación de los conidios de *M. anisopliae* (Zimmermann 1982). Un aspecto importante que debe considerarse es la pigmentación de los conidios; ya que los aislados con pigmentaciones oscuras son más estables que los conidios con pigmentaciones claras ante la exposición al sol (Ignoffo y García, 1992). El desarrollo de un hongo como agente de control biológico en campo, debe incluir formulaciones con protección de luz ultravioleta (Moore *et al.*, 1996; Hunt *et al.*, 1994; Alves *et al.*, 1998; Shah *et al.*, 1998).

La persistencia de los hongos entomopatógenos en el campo depende de diversos factores bióticos y abióticos como la temperatura, HR, suelo, agua, agroquímicos, artrópodos del suelo y plantas (Keller y Zimmermann, 1989). Según diversos estudios sobre persistencia que se han hecho con *M. anisopliae* en suelo, se ha visto que el hongo puede persistir durante meses, incluso años, dependiendo de la cepa y las condiciones del sitio donde fue asperjado (Müller y Zimmermann, 1980; Vänninen *et al.*, 2000; Rangel *et al.*, 2005).

Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es reconocida por la OMS como una de las 13 enfermedades tropicales con mayor descuido en diversos países de América Latina; debido a la problemática social y económica que se presenta en estos lugares (Rassi Jr *et al.*, 2010). Es la causa de alrededor de 43,000 muertes al año, en su mayoría por cardiomiopatías cuando el parásito se aloja en fibras cardiacas (World Health Organization, 2002).

Está presente desde Norteamérica, Centroamérica, hasta Sudamérica, representando un problema de salud pública en los países de estas regiones; especialmente en áreas rurales relacionadas con la pobreza y malas condiciones de vivienda. En países como Estados Unidos, Canadá, y diversas partes de Europa, la enfermedad se presenta como consecuencia de las migraciones humanas de regiones endémicas (Moncayo y Silveira., 2009).

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, es causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi* (Mastigophora: Sarcomastigophora: Kineoplastidae) descubierto por Carlos Chagas en 1909. Este protozooario puede transmitirse de forma vectorial a seres humanos, mamíferos salvajes y domésticos mediante la picadura de una chinche (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) (Rassi *et al.*, 2002); pero también se puede transmitir por mecanismos no vectoriales como son la transfusión sanguínea, trasplantes de órganos, durante la gestación de madre a infante (Villalba *et al.*, 1992; Cimo *et al.*, 1993; Leiby *et al.*, 1999; US Centers for Disease Control and Prevention, 2006) y otros casos más raros como la ingestión de comida o líquidos contaminados con el parásito (Pereira *et al.*, 2009).

Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* comprende varias etapas de desarrollo tanto en triatóminos, los cuales parecen no ser afectados y otras etapas en los mamíferos, que es donde se desarrolla la enfermedad. El tripomastigote sanguíneo es la forma del parásito que se encuentra en la sangre de mamíferos hospederos. En la transmisión

vectorial, el triatómino al alimentarse de sangre también absorbe los parásitos y una vez dentro del intestino del insecto se transforman en epimastigotes, éstos se replican por fisión binaria y migran hacia el recto del triatómino donde se diferencian en tripomastigotes metacíclicos (forma infectante). El triatómino libera los parásitos al defecar, mientras se está alimentando de sangre. Los parásitos penetran en el hospedero mamífero a través de las micro heridas en la piel que se generan durante el rascado o a través de mucosas y superficies conjuntivales (signo de Romaña) (Guhl, 2009). Una vez dentro del hospedero, *T. cruzi* se diferencia en amastigotes (forma subesférica aflagelar), se replica por fisión binaria y posteriormente se transforman en tripomastigotes sanguíneos con crecimiento de un flagelo. Cuando se ha alcanzado un número considerable de parásitos dentro de la célula, ocurre una lisis celular, y el parásito invade tejidos adyacentes, se propaga en vasos linfáticos y torrente sanguíneo para acceder a sitios distantes donde es más probable que un triatómino al alimentarse pueda succionarlos nuevamente (Hoare y Wallace, 1966; Brener 1971; Haro *et al.*, 1995; Tyler y Engman, 2003; Rassi *et al.*, 2009) (Fig. 4).

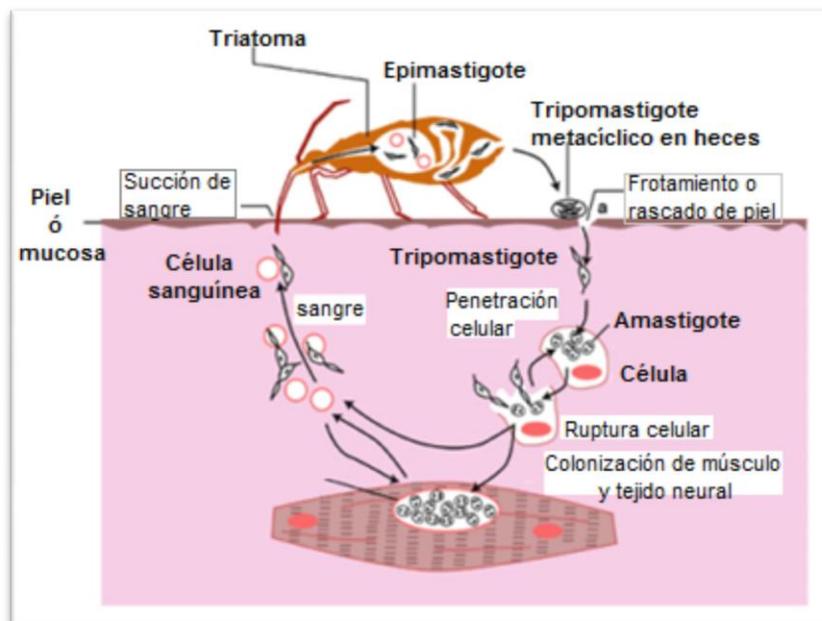


Figura 4. Representación esquemática del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Modificada del artículo de Macedo *et al.* (2002).

Transmisores

La enfermedad de Chagas es transmitida a humanos y a una gran diversidad de especies de animales domésticos (perros, gatos, burros, caballos) y animales silvestres (roedores, marsupiales, armadillos, entre otros) por los triatóminos; los cuales viven de forma silvestre, en el peridomicilio o dentro de las viviendas y tienen hábitos nocturnos (Rassi Jr. *et al.*, 2010).

Los triatóminos son hematófagos obligados, en su ciclo de vida presentan 5 estadios ninfales y tardan en promedio de 3 a 8 meses en llegar a adultos, los cuales viven entre uno y dos años (Lent y Wygodzinsky, 1979; Harwood y James, 1993; Chester-Beaver *et al.*, 2003) (Fig. 5).



Figura 5. Ciclo de vida de *Meccus pallidipennis*. a) huevos; b) ninfa estadio 1 (N1); c) ninfa estadio 2 (N2); d) ninfa estadio 3 (N3); e) ninfa estadio 4 (N4); f) ninfa estadio 5 (N5); g) hembra adulta; h) macho adulto. Tomado y modificado de IREKANI, Instituto de Biología-UNAM; Salazar Schettino *et al.* (2012).

Los adultos de la especie *Meccus pallidipennis* miden de 30-35 mm de longitud; tienen el cuerpo ancho y en especial el abdomen, con color que va del café oscuro a negro; las placas conexivales con manchas de color rojo anaranjado de tamaño variable y el corium con setas cortas. La cabeza es ligeramente más larga que el pronoto y el primer segmento de la antena se extiende más allá del vértice del clípeo. El pronoto está fuertemente constreñido a nivel de surcos transversos, no granuloso pero con setas cortas y los hemiólitros y alas con los urotergitos expuestos (Fig. 5 g y h) (Lent y Wygodzinsky, 1979).

México es uno de los países con el mayor número de especies de triatóminos; se han reconocido 32 de las cuales 13 son consideradas importantes vectores de *T.*

cruzi (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006; Salazar-Schettino et al., 2010). Los géneros más importantes son *Triatoma* y *Meccus* (Rodríguez-Bataz et al., 2011) ya que presentan el mayor índice de infección, con el 67% de transmisión de *T. cruzi* a humanos en el país (Ramsey y Schofield, 2003).

El género *Meccus* (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae) (anteriormente complejo *Phyllosoma Triatoma*) incluye 6 especies mexicanas endémicas (Galvão et al., 2003). *Meccus pallidipennis* está presente en 13 estados del país, Colima, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz, y Zacatecas (Salazar-Schettino et al., 2010; Martínez-Ibarra et al., 2011; Benítez-Alva et al., 2012), es considerado uno de los vectores epidemiológicos más importantes en la transmisión de *T. cruzi*; debido a su preferencia por los hospederos mamíferos, presenta una alta tasa de infección en humanos y reservorios animales (Zárate y Zárate, 1985; Martínez-Ibarra et al., 2008; Martínez-Ibarra et al., 2014). Habita de manera predominante en el peridomicilio (50-m alrededor de las casas) y se piensa que sus etapas de desarrollo del ciclo de vida, las lleva a cabo cerca o debajo de las piedras ya que ahí es donde se han encontrado los estadios ninfales; y los adultos son quienes ingresan a las viviendas para alimentarse (Bautista et al., 1999; Salazar-Schettino et al., 2010). Aunque los triatóminos que habitan el peridomicilio representan un menor riesgo en la dinámica de transmisión parasitaria a humanos comparado con los intradomiciliados; ambos deben tener diversas medidas de control por el riesgo que representan en la transmisión del parásito a los humanos. Las medidas deben incluir educación para la salud, mejoramiento de las viviendas y control de vectores (Salazar-Schettino et al., 2010).

2. OBJETIVOS

Objetivos generales

- Evaluar la virulencia de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae*, especies de hongos entomopatógenos, en ninfas de *Meccus pallidipennis*, insecto transmisor de la enfermedad de Chagas.
- Detectar cepas silvestres de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* con sondas moleculares específicas en triatomas de *M. pallidipennis* provenientes de una localidad seleccionada para el estudio.
- Determinar la presencia de *M. anisopliae* en triatóminos recolectados posterior a su aplicación en el peridomicilio de viviendas seleccionadas en la localidad de estudio.

Objetivos particulares

- 1) Determinar y comparar la virulencia de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* en los estadios N2, N3 y N4 de *M. pallidipennis*, mediante la determinación del tiempo letal medio (TL50).
- 2) Estandarizar el método de detección molecular con una sonda molecular específica para *I. fumosorosea* y *M. anisopliae*, en especímenes de *M. pallidipennis* infectados.
- 3) Determinar molecularmente la presencia de cepas silvestres de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* en ejemplares de *M. pallidipennis* provenientes de la localidad seleccionada, Anenecuilco, Morelos, previo a la aplicación del hongo.
- 4) Detectar molecularmente la infección de *M. anisopliae* en *M. pallidipennis*, en triatomas obtenidos después de la aplicación del hongo en la localidad.

3. ANTECEDENTES

La urbanización no planeada, los cambios ambientales y la movilidad humana, han tenido un impacto significativo en la transmisión de enfermedades por vectores en años recientes.

Los micoinsecticidas son una alternativa de control en insectos vectores de enfermedades en sitios donde éstos son un problema de salud pública.

Trabajos realizados con *M. anisopliae* y *B. bassiana*, han tenido resultados favorables en el control de vectores de enfermedades como la malaria, dengue, Chikungunya, virus del nilo, entre otras. Mosquitos adultos de los géneros *Anopheles*, *Aedes* y *Culex* son tratados con estos HE y se ha visto que han reducido significativamente su longevidad (Scholte *et al.*, 2003; 2005; 2007), su tasa de sobrevivencia, la fecundidad y alimentación (Scholte *et al.*, 2006); además de tener un efecto inhibitorio en el desarrollo de los parásitos de la malaria en el mosquito (Blanford *et al.*, 2005).

Rocha y Luz (2011) reportan en la región central de Brasil, la actividad patogénica de diferentes especies de HE en *Triatoma infestans*; todas las ninfas tratadas con *Isaria cateniannulata* y *Metarhizium robertsii* murieron en menos de 20 días. Los autores demostraron que los HE probados, son altamente virulentos y podrían emplearse como micoinsecticidas en el control de triatóminos.

La importancia que tiene *M. pallidipennis* como vector de *T. cruzi*, ha llevado a buscar alternativas de control en México. En el 2011 el grupo de trabajo de Toriello y colaboradores realizaron un estudio de virulencia de 2 cepas de *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae* en huevos de *M. pallidipennis* en condiciones de laboratorio. Los huevos presentaron un porcentaje de mortalidad acumulada de 92% (2.77 días) cuando éstos se trataron con la cepa EH-511/3 de *I. fumosorosea* y de 88% (3.18 días) cuando se infectaron con la cepa (EH-473/4) de *M. anisopliae* (Flores-Villegas *et al.*, 2011). Para determinar cuál de las dos cepas es la mejor opción fúngica para el control de triatóminos en todos sus estadios, se requiere llevar a cabo bioensayos de

virulencia tanto en ninfas como en adultos, ya que éstos son los que representan el mayor riesgo para la transmisión de *T. cruzi* a humanos.

En 2014 Zumaquero y colaboradores, realizaron un estudio de virulencia de *B. bassiana* en *M. pallidipennis* con diferentes concentraciones del hongo; en un periodo de dos semanas se obtuvo la muerte de la totalidad de los triatóminos en un rango de concentración letal 50 (CL50) entre 5.3×10^6 a 11.5×10^6 .

En otros trabajos sobre enfermedades parasitarias como malaria, también se investigó el uso de hongos entomopatógenos para el control de los insectos vectores, *Anopheles* y *Aedes aegypti* para romper la cadena de transmisión y evitar el uso de los insecticidas químicos (Thomas y Read, 2007; Alvernaz *et al.*, 2009, Kanzok y Jacobs-Lorena, 2006, Scholte *et al.*, 2004). También existen trabajos de *M. anisopliae* para el control de la mosca *Culicoides nubeculosus* que transmite diferentes virus en el ganado, especie que pueden aplicarse sin problema para las reses (Ansari *et al.*, 2011). La gran diversidad de hospederos que tienen los hongos entomopatógenos, ha permitido emplearlos en muchos otros insectos que transmiten patógenos. Uno de estos trabajos es el de Mnyone *et al* (2012) en el cual realiza un estudio en la larvas de la pulga *Xenopsylla brasiliensis*, donde se probaron los hongos *M. anisopliae* y *B. bassiana* con resultados del 100% de mortalidad de los insectos en un corto tiempo (9-11 días). *M. anisopliae* por su amplia gama de hospederos, se ha empleado también en otros artrópodos; un estudio de Polar *et al* (2005) mostró la virulencia de este hongo en garrapatas *Boophilus microplus*, lo que demuestra que el uso de estos hongos entomopatógenos no se limita a insectos, sino que también se pueden emplear en otros artrópodos de riesgo para la salud del humano.

En México, actualmente existe poca información relacionada con el control biológico en distintas especies endémicas de triatóminos y sus estadios ninfales. Generar información sobre las especies de HE que infectan exitosamente a los triatomas en todo su ciclo de vida, es imprescindible para obtener un agente de control de vectores que sea útil en las comunidades mexicanas donde se encuentran los triatóminos.

Diagrama experimental

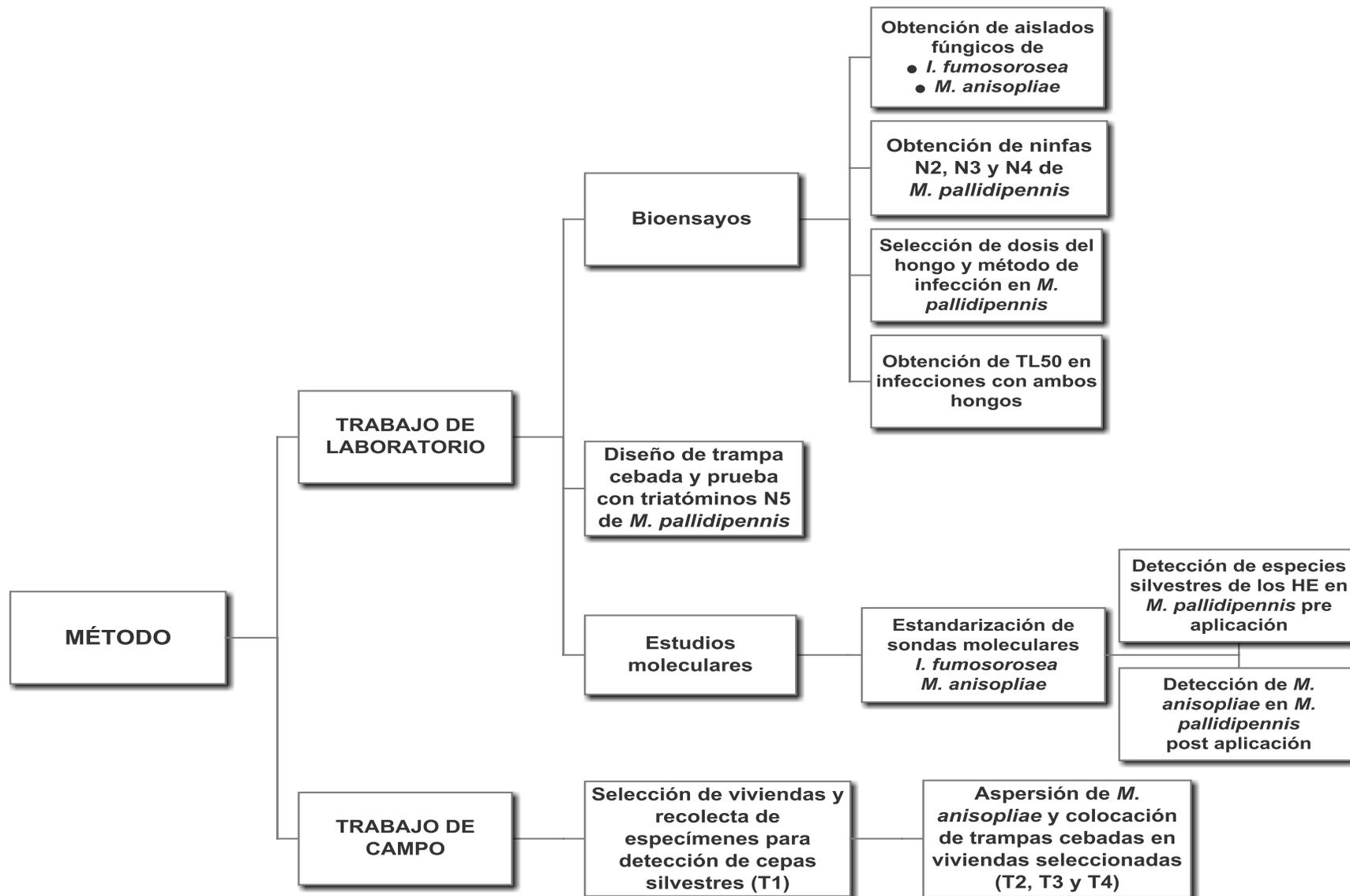


Figura 6. Diagrama experimental.

4. MÉTODOS

Trabajo de laboratorio

Aislados fúngicos

Los hongos empleados en este trabajo se encuentran depositados en la colección de cultivos del Laboratorio de Micología Básica, Unidad de Micología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, registrada en la “World Federation of Culture Collections” (WFCC) como BMFM-UNAM 834. La tabla 1 muestra la relación de los hongos que se emplearon, tanto para los bioensayos de virulencia como para la estandarización de las sondas de DNA utilizadas en la detección molecular.

Tabla 1. Datos de las cepas estudiadas.

Hongo	Hospedero	Origen
<i>M. anisopliae</i> EH-473/4	<i>Aeneolamia</i> sp.	San Luis Potosí, MX
EH-478	<i>Aeneolamia</i> sp.	Veracruz, MX
EH-476/3	<i>Aeneolamia</i> sp.	Oaxaca, MX
EH-477/5	<i>Aenolamia</i> sp.	
<i>Metarhizium flavoviride</i> ARSEF-1184	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	Francia
<i>Metarhizium acridum</i> EH-484	<i>Austracis guttulosa</i>	Australia
<i>I. fumosorosea</i> EH-511/3	<i>Bemisia</i> sp. (heteroptera)	Cultivo de sandía Armeria, Colima, MX
<i>Paecilomyces farinosus</i> EH-402	Desconocido	Desconocido
<i>Paecilomyces carneus</i> EH-698	Quistes de nematodo <i>Globodera rostochiensis</i>	Perote, Veracruz, MX

ARSEF= Agricultural Research Service of Entomopathogenic fungi, EEUU; EH= especie de hongo, clave interna de la Facultad de Medicina, Unidad de Micología; CSIRO= Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia.

Bioensayos de virulencia con *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* en ninfas de *M. pallidipennis*

Para las infecciones de los triatóminos se emplearon cultivos monospóricos de dos cepas de los hongos: *I. fumosorosea* EH-511/3 y *M. anisopliae* EH-473/4, previamente caracterizados fenotípicamente (Mier *et al.*, 2005; Toriello *et al.*, 2003; 2006; 2008; Castellanos *et al.*, 2007; 2008). Las especies fúngicas se cultivaron en medio agar papa dextrosa (APD, g/L: papa 300 g, dextrosa 20 g, agar 15 g y agua destilada 1000 ml) y se incubaron a 28°C durante ocho días, previo a su uso.

a) Suspensiones conidiales

Los conidios se desprendieron del tubo con agar mediante un asa micológica y se adicionó Tween 80 al 0.5%. Con un vórtex se mezcló la suspensión hasta obtener una mezcla homogénea. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de estricta esterilidad.

Se realizaron diluciones 1:10 y 1:100 a partir de la suspensión original de conidios, con la finalidad de obtener una dilución cuantificable. Los conidios se contaron en cámara de Neubauer y la suspensión se ajustó a una concentración de 1×10^7 conidios/ mL.

b) Viabilidad de los conidios

La viabilidad de los conidios se corroboró mediante el porcentaje de germinación. Para ésto se tomó una alícuota de 30 μ l de la suspensión de conidios ajustada previamente y se sembró en una caja de Petri con medio APD, posteriormente se incubó a 28°C, durante 10 h. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada bioensayo. A las 10 h se examinó cada caja de Petri con microscopio óptico y se midió el largo del tubo germinativo de la mayoría de los conidios, el cual debió ser igual o mayor al largo del conidio (Moore, 1996).

c) Insectos

Se utilizó la colonia de *M. pallidipennis* del laboratorio de Biología de Parásitos, Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM. A partir de parejas de triatóminos adultos, se obtuvieron en condiciones controladas, los estadios ninfales N2, N3 y N4.

d) Desinfección de los triatóminos

Para desinfectar los insectos previo al bioensayo, se llevó a cabo una serie de lavados; que consistió en cuatro fases para eliminar contaminantes del insecto, antes de la infección con los hongos entomopatógenos:

- 1) Inmersión del insecto con la ayuda de una pinza en una caja de Petri estéril con agua Milli Q estéril, por 2 seg.
- 2) Inmersión del insecto en hipoclorito de sodio al 2.25%, por 2 seg.
- 3) Nuevamente se lavó el insecto en agua Milli Q estéril, por 2 seg.
- 4) Por último, en una caja de Petri con un círculo de papel filtro estéril de 60 x 15 mm se colocó al insecto y se dejó secar en la campana de flujo laminar.

e) Infecciones de triatóminos

Se realizaron bioensayos preliminares para determinar el método de infección más apropiado. Para éstos bioensayos se emplearon ninfas de cuarto estadio (N4) de *M. pallidipennis* y una suspensión conidial de 1×10^7 conidios/ mL. En el primer bioensayo se colocaron las ninfas para que caminaran durante 1 min en cajas de Petri de 60 x 15 mm con y sin papel filtro impregnado con 30 μ L de la suspensión de conidios. En el segundo bioensayo, los especímenes se sumergieron en 3 mL de la suspensión fúngica durante 5 seg y en el tercer bioensayo se depositaron 30 μ L de la suspensión de conidios en el pronoto del insecto.

Para los bioensayos en ninfas N2, N3 y N4 los triatóminos se organizaron en grupos de 25 ninfas en tres repeticiones (75 ejemplares) y 25 insectos testigo por cada estadio. Se empleó una suspensión de conidios con una concentración de 1×10^7 conidios/ mL. El método para realizar las infecciones fue el depósito de 30 μ L de la suspensión fúngica en el pronoto del insecto (15 μ L y después de 30 min 15 μ L). Se llevaron a cabo por triplicado para cada uno de los estadios, con 75 ejemplares en total. Se utilizaron 25 insectos testigo por bioensayo y por cada estadio ninfal.

Una vez realizadas las infecciones de los triatóminos, éstos se colocaron en cajas de Petri de 60 x 15 mm con papel filtro estéril y se mantuvieron en una incubadora a 28°C por 24 h. Pasado el tiempo, cada espécimen se transfirió a una caja de Petri de 60 x 15 mm con agar/agua al 1.5% (15 g/L) y se introdujo nuevamente en la incubadora. Los insectos se observaron cada 24 h con microscopio estereoscópico (Olympus SZ-CTV®) para el registro de la presencia de las hifas en el cuerpo del insecto, la movilidad y la muerte de la ninfa (considerando ésta por la ausencia absoluta de movimiento, aún cuando fue estimulado).

Análisis estadístico

Diariamente se registró la sobrevivencia y muerte de los triatóminos de cada bioensayo para calcular el TL₅₀.

El TL₅₀ se refiere al tiempo en el cual muere el 50% de los insectos que se han sometido al experimento; y éste se calculó por análisis Probit mediante el programa estadístico Polo Plus Versión 1.0 (2002-2011).

De cada estadio de *M. pallidipennis* infectado con *I. fumosorosea* o *M. anisopliae* se obtuvo el porcentaje de la mortalidad acumulada (% MA), el cual se comparó entre estadios a los 5 y 6 días posteriores a la infección, para determinar si existen diferencias en la mortalidad entre los estadios ninfales de los triatóminos con cada hongo. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) ($\alpha = 0.05$), se utilizó el software InfoStat para Windows versión 2009 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Para los valores porcentaje de mortalidad acumulada de cada hongo y cada estadio, se realizó una transformación angular (arco

seno) a fin de ajustarlos a una distribución normal y evidenciar las diferencias. En caso de haber diferencias se aplicó una prueba de LSD Fisher para comparar dos varianzas.

Identificación de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* mediante las sondas moleculares específicas

Se emplearon sondas de DNA específicas a cada hongo para detectar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cepas nativas en triatóminos recolectados en el campo y para corroborar la infección en triatóminos.

Para la amplificación de las dos sondas de DNA de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* diseñados previamente por Arroyo (2007) y Brunner (2012) respectivamente, se estandarizaron las condiciones de PCR. Se probaron las sondas con DNA de diferentes especies de *Isaria* y de *Metarhizium*, DNA de otros hongos entomopatógenos afines a estos hongos, así como con DNA de triatóminos infectados con ambos hongos en el laboratorio.

a) Obtención de micelio para la extracción de DNA

Los hongos se sembraron en tubos de ensayo con medio APD y las condiciones antes mencionadas. De cada hongo que se sembró previamente, se preparó una suspensión conidial vertiendo 10 mL de Tween 80 al 1% en el tubo de siembra y raspando el hongo con una asa microbiológica. Las suspensiones que se obtuvieron de cada hongo, se sembraron por separado en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo YPG [extracto de levadura al 1% (Universal Flavors, México), peptona de soya al 1% (Bioxon; México, D.F) y dextrosa al 4% (Droguería Cosmopolita, México D.F.)] El hongo sembrado en cada matraz se mantuvo en una incubadora a 28°C con agitación (43 oscilaciones por minuto aproximadamente) por 7 días. El micelio se obtuvo por filtración en un embudo Buchner con papel filtro estéril. Se lavó el micelio con agua Milli Q estéril y se secó con papel filtro. Todo el procedimiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar, en

condiciones de esterilidad. Para la purificación del DNA de cada hongo, se tomó un botón del micelio húmedo obtenido.

b) Purificación del DNA de los aislados fúngicos

Se utilizó el kit Dneasy Plant mini (Qiagen, GmbH, Hilden, DE) y se siguieron las instrucciones de la casa comercial con algunas modificaciones. Cada hongo procesado de modo independiente. Se depositaron 100 mg de masa micelial húmeda en microtubos de 1.5 mL con 0.2 g de perlas de vidrio de 425-600 μm (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) estériles y se adicionaron 200 μL de amortiguador de extracción AP1 del kit. Enseguida, los tubos fueron colocados y sometidos a agitación en el equipo FastPrep24™ (Thermo Savant Instruments, USA) por 3 ciclos de 6m/s por 40 seg. Se adicionaron 4 μL de RNAsa (100 mg/mL), agitando en el vórtex e incubando la mezcla por 10 min a 65°C. Después se agregaron 130 μL de amortiguador AP2 y la mezcla se mantuvo en hielo por 5 min. Posteriormente, se centrifugó por 5 min a 13,200 rpm, el volumen total del sobrenadante se transfirió a una columna QIAshredder mini spin del mismo kit sostenida por un tubo colector de 2 mL y se centrifugó a 13,200 rpm por 2 min. Al sobrenadante obtenido se midió el volumen y se agregaron 1.5 volúmenes del amortiguador AP3/E, mezclando bien con una micropipeta. En una nueva columna DNeasy mini spin con tubo colector de 2 mL, se transfirieron 650 μL de la mezcla anterior y se centrifugó durante 1 min a 9,000 rpm desechando el sobrenadante obtenido; el paso se repitió hasta completar el volumen total de la muestra. Se colocó la columna en un nuevo tubo colector, se agregaron 500 μL de amortiguador AW y se centrifugó a 9,000 rpm por 1 min, descartando el líquido del tubo colector. Se adicionaron 500 μL de buffer AW nuevamente a la columna y se centrifugó a 13,200 rpm por 2 min, descartando el líquido del tubo colector y se centrifugó nuevamente a 13,200 rpm por 1 min. Para realizar los lavados con el amortiguador AW, se cambiaron los tubos colectores. Para la elución se colocó la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se adicionaron 100 μL del amortiguador de elución AE en cada columna, se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 9,000 rpm durante 1 min. La pureza y concentración de la muestra de DNA se determinó mediante un espectrofotómetro Denovix DS-11 (Denovix. Inc., Wilmington, USA) y

cada muestra se ajustó a 10 ng/μL en alícuotas de 50 μL, que se almacenaron en un cuarto frío a 4°C para su posterior utilización.

c) Purificación de DNA de triatóminos

Para la purificación del DNA de todos los triatóminos, se empleo el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen). Se maceró cada insecto en un mortero individual por cada insecto usando nitrógeno líquido. Se colocaron aproximadamente 50 mg del insecto macerado en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL con 0.2 g de perlas de vidrio (SIGMA, 425-600 μm) estériles y se agregaron 180 μL de amortiguador ATL y 20 μL de proteinasa K. Posteriormente, los tubos fueron agitados con el equipo Fast Prep24™ y se incubaron a 65°C por 15 h, aproximadamente. Pasado el tiempo, se agregaron 200 μL de amortiguador AL y 200 μL de Etanol (96%) y se homogeneizaron en un vórtex por 15 seg. Con una micropipeta se vertió toda la mezcla en una columna de Dneasy Mini spin y se centrifugó a 8,200 rpm por 2 min, descartando el tubo colector. Para realizar los lavados se colocó la columna Dneasy Mini spin en un nuevo tubo colector de 2 mL y se agregaron 500 μL de amortiguador AW1 centrifugándose a 8,200 rpm por 2 min; descartando el líquido del tubo colector. Este paso se repitió nuevamente para asegurarnos de que la membrana quedara limpia. Para realizar el siguiente lavado de la columna Dneasy Mini spin que contiene el DNA, se colocó ésta en un nuevo tubo colector de 2 mL y se vertieron 500 μL de AW2 centrifugándose por 4 min a 14,000 rpm. Para secar por completo la membrana, se realizó un último ciclo a la misma revolución pero sólo por 1 min. Las columnas se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se vertieron 100 μL de AE (amortiguador de elución), dejándose reposar por 15 min a temperatura ambiente y finalmente, se centrifugaron por 1 min a 8,200 rpm.

La concentración y la pureza del DNA de cada muestra fueron determinadas con la ayuda de un espectrofotómetro Denovix DS-11 y cada muestra fue ajustada a 10 ng/μL en alícuotas de 50 μL, que fueron almacenadas en un cuarto frío a 4°C para ser utilizadas posteriormente.

d) Amplificación del DNA de *I. fumosorosea* por el marcador molecular AFLP E-AA/M-CTA124 mediante una PCR semi anidada

Para la detección del hongo *I. fumosorosea* (cepa EH-511/3) se utilizó un marcador tipo SCAR (Gen Bank clave de acceso: JF956987) descrito por Arroyo (2007). Para la primera reacción de PCR se usaron los oligonucleótidos F 5'-CAAGACTTGCCAGAGAATCG-3' y R 5'-CGCGCACATGTAACAACCTCT-3', obteniendo un fragmento de 124 pb; para la segunda PCR (semianidada) se emplearon los oligonucleótidos F 5'-CAAGACTTGCCAGAGAATCG-3' y R 5'-GGGGATCGCAATAATCAACC-3' generando un producto final de 103 pb.

Las mezclas de ambas reacciones se realizaron en tubos de PCR de 200µL con un volumen final de 25 µL conteniendo: amortiguador de PCR (BIOX) a 1 X; dNTPs Gene Amp® dNTPs (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) 100 µM; MgCl₂ a 1.5 mM; oligonucleótidos (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 100 pmoles/µL; 1 U de Taq polimerasa (Fermentas, San Diego, Ca) y DNA a 10 ng/2µL para la primera reacción, mientras que para la segunda PCR se utilizaron 2 µL del producto de la primera reacción de PCR. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador T100™ (Bio-Rad, Hercules, CA). Las condiciones de ciclado para ambas PCR fueron: para la desnaturalización 3 min a 94°C; alineación 1 min a 94°C, 1min a 66°C y 2 min a 72°C (25 ciclos) y la extensión 5 min a 72°C.

Las muestras de DNA de hongos que se emplearon para probar la especificidad de la sonda fueron *I. fumosorosea* (EH-556), *Lecanicillium lecanii* (EH-572), *Paecilomyces farinosus* (EH-402) y *P. carneus* (EH-698). También se utilizó DNA de *M. pallidipennis* infectado con *I. fumosorosea* (EH-511/3). Finalmente se utilizó como testigo positivo el DNA de *I. fumosorosea* (EH-511/3), para los testigos negativos se emplearon DNA de *M. anisopliae* (EH-473/4) y DNA de triatóminos sin infección y un testigo del sistema sin DNA y solo con agua Milli Q.

Los productos de amplificación de todas las muestras se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 0.5 X teñido con Gel Red™ (Biotium Inc. CA, USA) y se utilizó como referencia de tamaño molecular una escala de Gene Ruler™ 100 pb plus DNA Ladder (Fermentas, Carlsbad, CA, US). El

corrimiento de la electroforesis fue a 90 V en amortiguador TBE en una cámara de electroforesis por 45 min. Las imágenes de los geles se capturaron en un fotodocumentador GelDoc™ XR (Bio-Rad, Hercules, CA).

e) Amplificación por PCR de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S de rDNA de *M. anisopliae*

Para obtener la región deseada de *M. anisopliae*, se emplearon los oligonucleótidos MAMX (Brunner, 2012) F 5'-GGGCTCCTGTTGCGAGTGTT-3' y R 5'-CACATTGCGCCCGTCAGTAT-3' que generaron un producto de amplificación de 188 pb.

La mezcla de reacción se realizó en un tubo para PCR de 200 µL con un volumen final de 25 µL, conteniendo: BIOX a 1 X; dNTPs a 200 µM; MgCl₂ 2.0 mM; oligonucleótidos (Sigma-Aldrich) 100 pmoles/µL; *Taq* Polimerasa (Fermentas) 1U y DNA 10 ng/2µL. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador T100™ (Bio-Rad) El programa de amplificación óptimo consistió en un ciclo de 5 min a 94°C; 3 ciclos de 1 min a 94°C, 30s a 65°C, 30s a 72°C y 1 ciclo de 5 min a 72°C y 10 min a 4°C. Para probar la especificidad de la sonda, se utilizaron muestras de DNA de diferentes aislados: como controles positivos se utilizaron las cepas (EH-470 y EH-473/4) de *M. anisopliae*; como controles negativos se emplearon las cepas *M. flavoviride* (EH-529), *M. robertsii* (ARSEF-2575), *M. pingshaense* (ARSEF-7929), *M. acridum* (EH-484) e *I. fumosorosea* (EH-511/3). También se utilizó DNA de *M. pallidipennis* infectado con *M. anisopliae* (EH-473/4) como control positivo; y como testigo negativo DNA de *I. fumosorosea* (EH-511/3), DNA de un triatómino sin infección y un testigo del sistema sin DNA y solo con agua Milli Q.

Trabajo de campo

Localidad

Anenecuilco, Morelos fue la localidad seleccionada para el estudio por la presencia de la enfermedad de Chagas en este estado (Secretaría de Salud/SUIVE/DGE, 2015). Está situada en el municipio de Ayala en el estado de Morelos; en la región de la Sierra Madre del Sur y el Eje Neovolcánico. Se encuentra entre los 18°46'41" Norte y 98° 59'10" Oeste a una altitud de 1239 msnm (Fig. 7). El clima es cálido subhúmedo y presenta una temperatura media anual de 24°C; las lluvias se presentan durante el verano en los meses de junio a septiembre y la precipitación media anual es de 900 .mm.

Organización del trabajo de campo por etapas

El estudio de campo se realizó en cuatro etapas (Fig. 8):

- Etapa 1: Selección de viviendas y recolecta de triatóminos para identificación de cepas silvestres de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae*.
- Etapa 2: Primera aspersión de *M. anisopliae* y colocación de trampas atrayentes con heces de triatóminos en el peridomicilio de las viviendas seleccionadas.
- Etapa 3: Segunda aspersión de *M. anisopliae* en el peridomicilio de las viviendas seleccionadas.
- Etapa 4: Colocación de trampas cebadas en el peridomicilio en las viviendas seleccionadas.

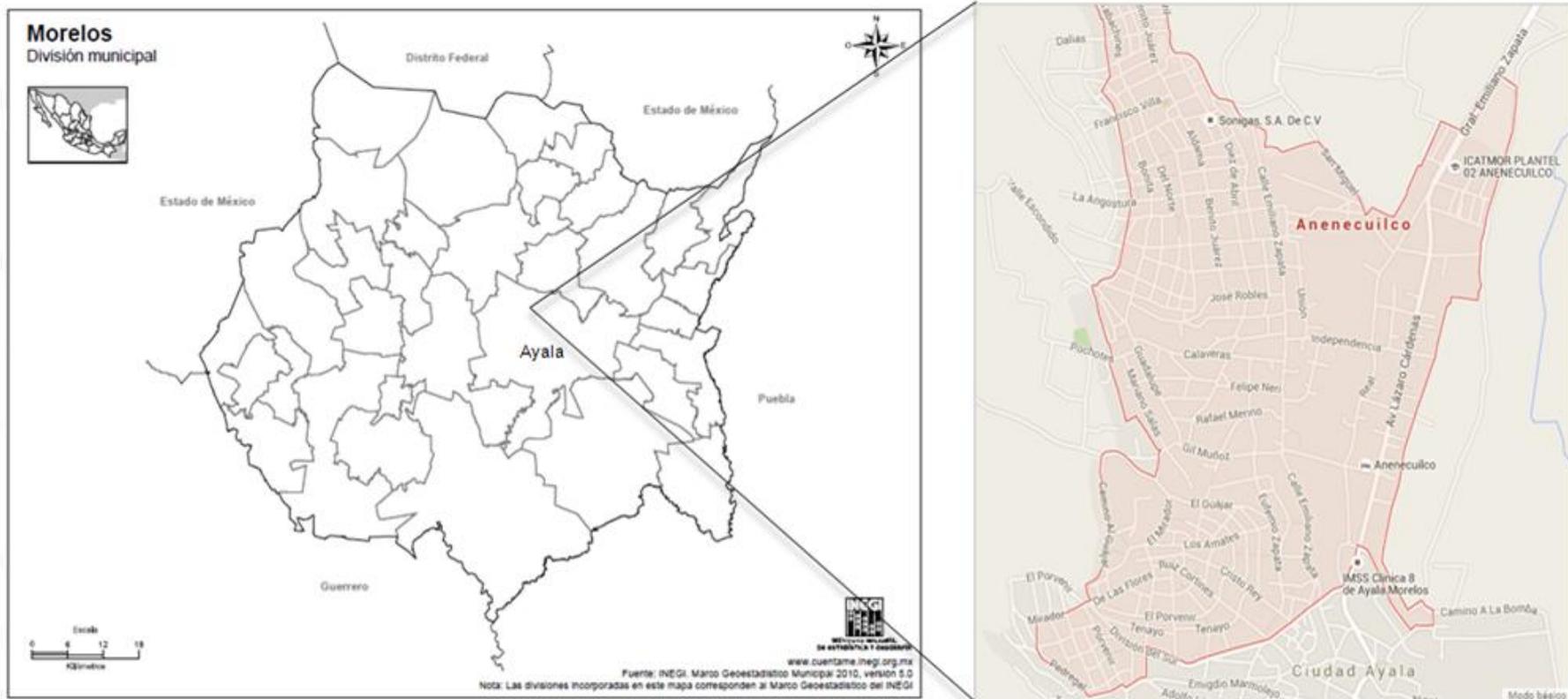


Figura 7. Mapa del estado de Morelos con acercamiento a la localidad de Aneneuilco, municipio de Ayala. Copiado y modificado de INEGI y Google Maps.

Trabajo de campo

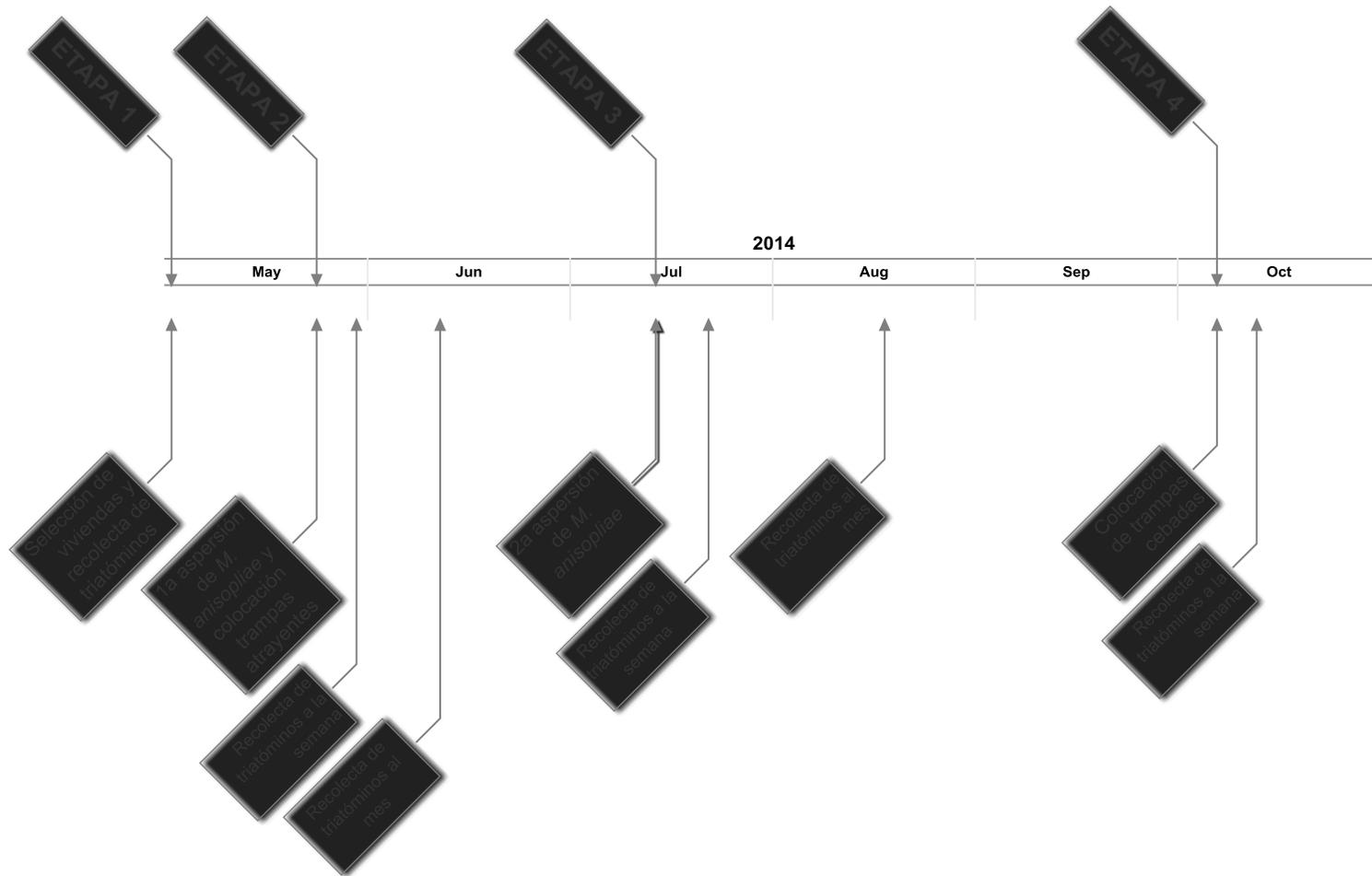


Figura 8. Cronograma de actividades realizadas en la localidad de Aneneuilco, Morelos. Etapa 1: Obtención de datos de la vivienda y recolección de insectos para identificación de cepas silvestres de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* (14 de mayo); Etapa 2: primera aspersión de *M. anisopliae* y colocación de trampas atrayentes de triatóminos en el peridomicilio (14 de mayo); Etapa 3: segunda aspersión de *M. anisopliae* en el peridomicilio de la vivienda (20 de junio); Etapa 4: Colocación de trampas cebadas en el peridomicilio (13 de octubre).

Etapa 1: Obtención de datos de la zona de estudio, recolecta y procesamiento de los triatóminos para búsqueda de cepas silvestres

a) Obtención de datos de las viviendas seleccionadas y recolecta de triatóminos

Se realizaron diferentes visitas a la población para informar a la comunidad sobre los signos y síntomas de la enfermedad, dinámica de transmisión del parásito, características de los triatóminos, prevención de la infección. Así mismo se informó sobre los métodos de prevención y control de triatóminos y las alternativas de control (uso de bioinsecticidas).

Se seleccionaron 12 viviendas en la zona sur y 12 en la zona centro de la localidad, incluyendo 3 viviendas como testigo en cada zona (Fig. 9), en las cuales se identificó la presencia de triatóminos y factores de riesgo asociados a la infestación (bardas de tecorrales, cúmulos de madera, de material de desecho, bardas de las casas sin repellar, animales domésticos y de corral como perros, gatos, gallinas, patos, conejos, cabras, entre otros). Se realizó un levantamiento de cédulas de los domicilios a estudiar en la localidad, para obtener datos de cada vivienda (nombre de representantes de cada familia, características de la vivienda, tamaño del terreno) y la firma del consentimiento informado.

Así mismo, se llevaron a cabo 2 visitas a cada una de las viviendas seleccionadas, para realizar una búsqueda y recolecta de triatóminos antes de la aplicación del hongo.

Los triatóminos que se recolectaron en esta etapa se etiquetaron con los datos de la vivienda y se depositaron en frascos hasta su procesamiento en el laboratorio.



Figura 9. Mapa de las zonas seleccionadas para el estudio en Anenecuilco, Morelos.

- b) Detección de cepas silvestres de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* en insectos obtenidos de Anenecuilco

Se recolectaron triatóminos en frascos etiquetados con los datos de la vivienda y sitio de recolecta. Todos los triatóminos recolectados fueron revisados para corroborar la infección por *T. cruzi* antes de procesarse, la revisión se realizó en el laboratorio de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina. Una vez revisados, los triatóminos se dividieron en 2 porciones. Una porción se colocó en una caja de Petri con agar/agua al 1.5% (15 g/L) y se mantuvo en incubación a 28°C por una semana para observar crecimiento fúngico e identificar cepas nativas de ambos hongos; la otra porción de cada triatómino se procesó siguiendo los métodos antes descritos, a fin de obtener el DNA y mediante un análisis de PCR con las sondas moleculares específicas determinar la presencia de cepas silvestres de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae*.

Etapas 2: Primera aspersión de *M. anisopliae* y colocación de trampas atrayentes de triatóminos

- a) Diseño de trampas atrayentes y colocación en las viviendas seleccionadas

Para las etapas 2 y 4 se utilizaron jaulas para ratones con un enrejado de metal con orificios pequeños de aproximadamente 0.3 cm, las cuales se prepararon de forma específica para cada una de las etapas con el propósito de atraer e infectar a los insectos.

En la etapa 2, se utilizaron jaulas que contenían papel periódico con heces de triatóminos como atrayente y se cubrió cada jaula con cinta adhesiva de manera que los insectos que caminaran sobre ésta, se quedaran pegados. Ya en el campo, las jaulas se asperjaron con misma suspensión de conidios de *M. anisopliae* que se aplicó en las viviendas (Fig. 10).



Figura 10. Colocación de trampa atrayente de triatóminos en el peridomicilio de una vivienda.

b) Formulación de *M. anisopliae* para aplicación en campo

Para la aplicación en las viviendas seleccionadas, *M. anisopliae* (EH-473/4) fue formulado en el laboratorio de Control Biológico en el Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma de Morelos (UAEM). La formulación consistió en conidios del hongo suspendidos en Tween 80 al 0.5%, a una concentración de 1×10^8 conidios/ mL, de la cual se utilizaron 4 litros por 100 m^2 por área a asperjar con una concentración final de 1×10^{12} conidios por Ha. El concentrado de conidios se suspendió en agua potable con las diluciones apropiadas y se llenaron las mochilas de aspersión en campo para la aplicación del bioinsecticida (Fig. 11).



Figura 11. Preparación de equipo y formulación para asperjar.

c) 1ª aplicación de *M. anisopliae*

La aplicación del bioinsecticida se llevó a cabo el 14 de mayo de 2014. El formulado de conidios de *M. anisopliae* se aplicó en la periferia de 18 viviendas seleccionadas entre la zona centro y sur de Anenecuilco, Mor (Fig. 12) y a 10 de éstas viviendas además se les colocó una jaula atrayentes de triatóminos. En 6 viviendas seleccionadas como testigo se asperjó únicamente Tween 0.5 8% sin hongo (Fig. 13).

La recolecta de triatóminos se llevó a cabo tanto a la semana como al mes de la aspersión del hongo en cada una de las viviendas donde se aplicó. Los triatóminos recolectados en esta etapa se procesaron para obtener hongos tanto por la técnica micológica tradicional como con la detección molecular, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.



Figura 12. Aplicación de *M. anisopliae* en la periferia de una vivienda en la zona sur de la comunidad seleccionada para el estudio.



Figura 13. Aplicación de Tween y agua sin hongo en una vivienda testigo.

Etapa 3: Aspersión de *M. anisopliae* en el peridomicilio de las viviendas seleccionadas

a) 2ª aplicación de *M. anisopliae*

La segunda aplicación del hongo *M. anisopliae* se realizó el 20 de junio de 2014. A la semana y al mes posterior a la aplicación, se realizaron recolectas de triatóminos para detectar insectos infectados con el hongo.

Etapa 4: Colocación de trampas cebadas de prueba en el laboratorio y posteriormente colocadas en la periferia de las viviendas seleccionadas

a) Diseño de trampas cebadas en el laboratorio

Se diseñó una trampa cebada que fue probada previamente en el laboratorio en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar). Para este fin, se emplearon las jaulas descritas anteriormente a las cuales se les introdujo un ratón vivo como atrayente de triatóminos, el ratón se mantuvo en condiciones adecuadas para su sobrevivencia de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM -062- ZOO- 1999 (Agricultura & Ganadería, 2008) (piso de aserrín, agua y alimento). La jaula se envolvió con cinta adhesiva de tal manera que los triatóminos al caminar sobre ésta, quedaran pegados. Finalmente se untó un concentrado de conidios de 2×10^9 /mL de *M. anisopliae* a la jaula.

La jaula se colocó en un recipiente de plástico vacío y dentro del recipiente se depositaron ninfas N5 de *M. pallidipennis*. El recipiente de plástico con la jaula dentro se colocó en una campana de flujo laminar y se dejó ahí por 3 días, permitiendo la entrada y salida libre de los triatóminos (Fig. 14).



Figura 14. Diseño de las trampas cebadas para la etapa 4 en campo.

Pasados los 3 días, se retiraron las jaulas de la campana, se tomaron los triatóminos del recipiente y se procesaron de acuerdo con los métodos descritos anteriormente para la detección de *M. anisopliae* mediante la sonda molecular específica.

b) Colocación de las trampas cebadas en las viviendas seleccionadas

Una vez concluido el experimento de las trampas de triatóminos cebadas con un ratón en el laboratorio y confirmada la infección de los insectos con el hongo; se programó una tercera visita el 13 de octubre de 2014 para la colocación de las trampas cebadas. En esta visita se seleccionaron 6 viviendas de las 24 que se habían seleccionado previamente; 3 viviendas en la zona centro y 3 en la zona sur. El criterio de selección se determinó por la participación de la población (estas personas fueron quienes nos entregaron más triatóminos) y también se tomó en cuenta las características de la vivienda para poder colocar las trampas cebadas con el ratón.

En cada vivienda se colocaron dos trampas cebadas, 1 dentro de la vivienda (bajo la cama o cerca de ésta) y 1 en la periferia (en el tecorrall, en cúmulos de leña o piedras o cerca de gallineros).

Las trampas cebadas empleadas en el campo, tuvieron el mismo diseño que las del laboratorio. Se introdujeron en las jaulas ratones vivos con suficiente comida y agua para 7 días. Las trampas se cubrieron con cinta adhesiva cubiertas con una pasta del hongo *M. anisopliae* a una concentración de 2×10^9 conidios/mL.

c) Recolecta de triatóminos después de la colocación de las trampas cebadas

Se pidió a las personas de cada vivienda, que recolectaran los triatóminos que encontraran y los depositaran en frascos etiquetados previamente que les fueron proporcionados. A los 7 días de la colocación de las trampas, se realizó una visita para la recolecta de los insectos. Los triatóminos fueron procesados en el laboratorio con las especificaciones antes descritas para detectar la presencia de *M. anisopliae* con la ayuda de la sonda molecular específica.

5. RESULTADOS

Trabajo de laboratorio

Ensayos preliminares para la selección del método de infección de los insectos

De los métodos de infección probados; el método de caminata del triatómino en caja de Petri con y sin papel filtro, no resultó efectivo para la infección de los triatóminos debido a que cuando caminaban sobre la caja de Petri no se desplazaron lo suficiente en el área con las esporas de hongo. El método de inmersión de las ninfas en una suspensión de conidios ajustada a 1×10^7 conidios/ mL, no nos permitió observar la evolución de la infección de los insectos durante el desarrollo del experimento, debido a que los insectos se morían en un tiempo muy corto (2-3 días) por la gran cantidad de conidio que se les pegaba. Se concluyó entonces que el mejor método de infección fue el depósito de 30 μ L de una suspensión de 1×10^7 conidios/ mL en el pronoto del triatómino, ya que de esta manera se podían obtener diferencias en cuanto a la mortalidad del insecto y se podía calcular el tiempo letal medio con la dosis seleccionada. Con este método de infección se llevaron a cabo todos los bioensayos de virulencia.

Bioensayos de virulencia en *M. pallidipennis* con *I. fumosorosea* y *M. anisopliae*

Los conidios utilizados para todos los bioensayos mostraron siempre un porcentaje de germinación mayor al 94%.

I. fumosorosea (EH511/3)

La presencia de las primeras hifas en el cuerpo del insecto se observaron al tercer día en N2 y N4, y al cuarto día en N3 (Fig. 15).

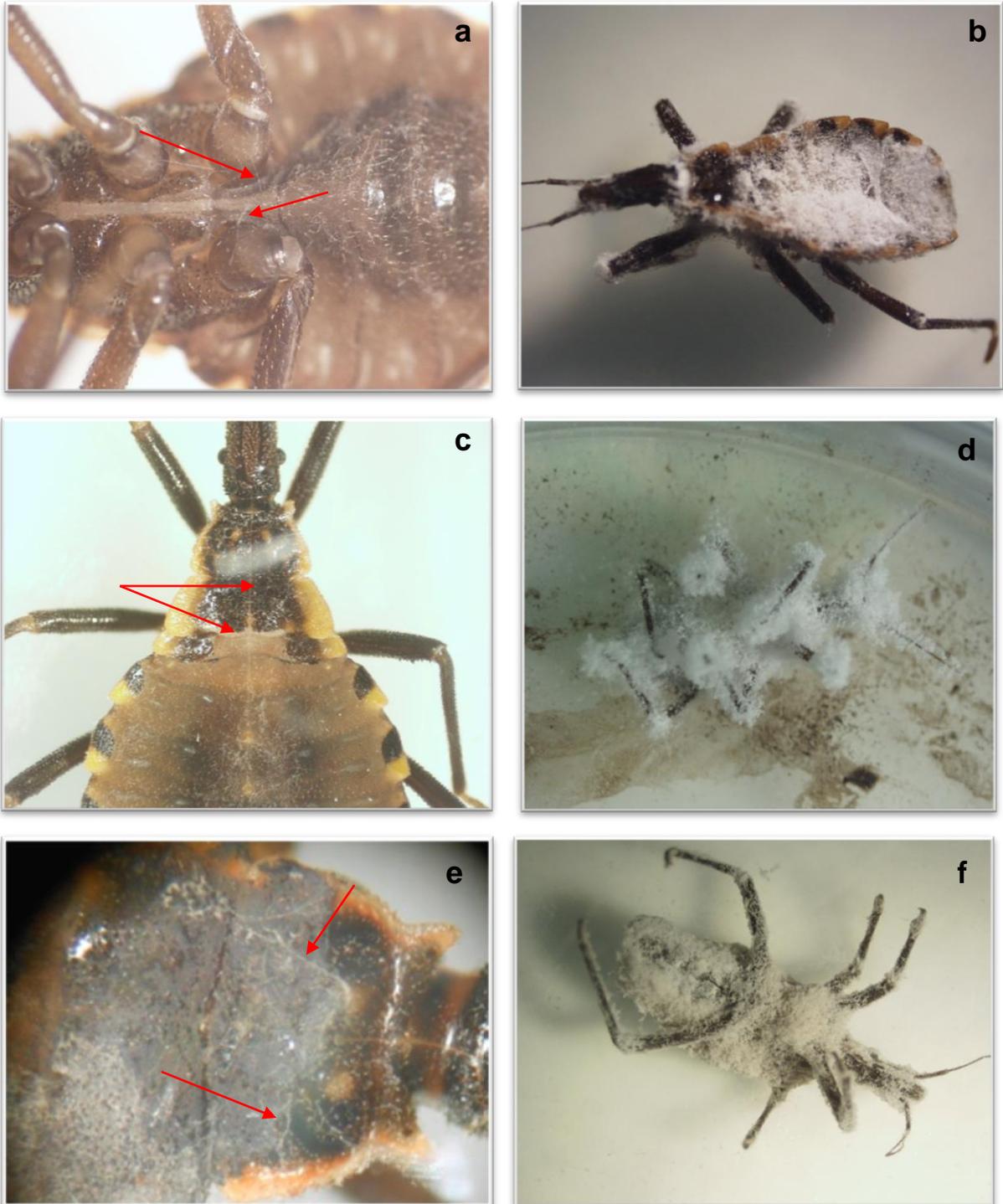


Figura 15. Infección de ninfas de *Meccus pallidipennis* por *Isaria fumosorosea* EH-511/3. Infección en N2 donde se observan hifas del hongo a los 3 días de la infección (flecha roja) (a) y la esporulación del hongo sobre la ninfa a los 15 días de la infección (b). Infección en N3 donde se observan hifas del hongo a los 4 días de la infección (flecha roja) (c) y la esporulación del hongo sobre la ninfa a los 20 días de la infección (d). Infección en N4 donde se observan hifas del hongo a los 3 días de la infección (flecha roja) (e) y la esporulación del hongo sobre la ninfa 21 días posteriores a la infección (f).

La mortalidad de N3 y N4 de *M. pallidipennis* después de la infección con *I. fumosorosea* fue baja en general; en N2, la mortalidad fue mayor al 50% después del cuarto día, del 95 % al día 15 y 97 % al día 30 de la infección (73 triatóminos muertos y dos vivos). En N3 se obtuvo el 43 % de mortalidad a los 30 días (32 triatóminos muertos y 43 vivos). En N4 se obtuvo la mortalidad del 50 % a los 22 días de la infección y el 84 % a los 30 días (63 triatóminos muertos y 12 vivos) (Tabla 2).

Tabla 2. Mortalidad acumulada de ninfas N2, N3 y N4 de *Meccus pallidipennis* infectadas con *Isaria fumosorosea*.

	% MA	% MA	% de MA		% MA	% MA	% MA
Día	N2	N3	N4	Día	N2	N3	N4
1	17	1	0	16	95	32	31
2	36	9	0	17	95	32	35
3	41	17	0	18	97	32	35
4	48	20	0	19	97	33	37
5	59	20	0	20	97	35	44
6	67	21	0	21	97	35	47
7	68	24	3	22	97	36	51
8	77	24	7	23	97	36	59
9	81	24	7	24	97	37	65
10	84	25	8	25	97	37	65
11	87	25	16	26	97	37	69
12	87	25	21	27	97	40	76
13	91	26	27	28	97	40	77
14	95	29	29	29	97	43	81
15	95	31	31	30	97	43	84

n= 75; % MA= porcentaje de mortalidad acumulada

Con el análisis Probit, la curva de % MA en N2 mostró la mortalidad del 50% de los insectos al cuarto día y del 97% a los 18 días después de la infección (Fig. 16).

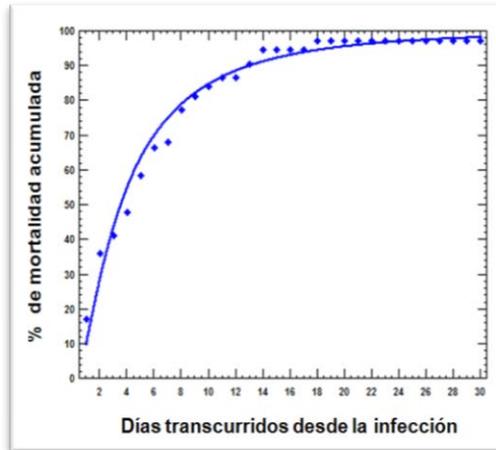


Figura 16. Mortalidad acumulada de N2 de *Meccus pallidipennis* infectadas con 1×10^7 conidios/ mL de *Isaria fumosorosea*.

En N3 la curva de % MA, mostró 43% a los treinta días posteriores a la infección (Fig. 17).

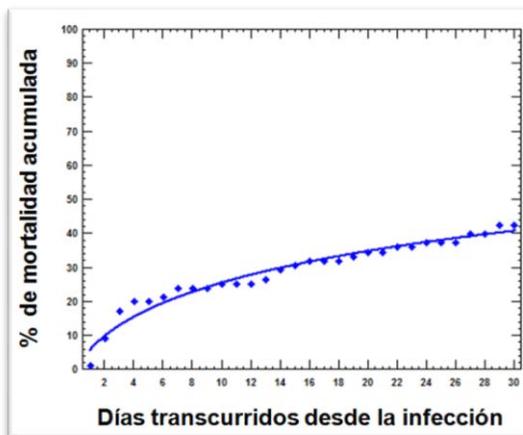


Figura 17. Mortalidad acumulada de N3 de *Meccus pallidipennis* infectadas con 1×10^7 conidios/ mL de *Isaria fumosorosea*.

En N4 la curva de % MA mostró el 50 % a los 21 días posteriores a la infección y el 84% de la mortalidad acumulada se obtuvo al día 30 posterior a la infección (Fig. 18).

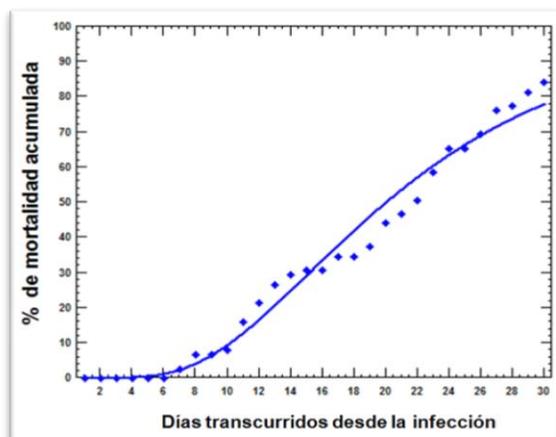


Figura 18. Mortalidad acumulada de N4 de *Meccus pallidipennis* infectadas con 1×10^7 conidios/mL de *Isaria fumosorosea*.

Mediante el análisis de regresión de Probit, se estimó el tiempo letal medio (TL50) y el tiempo letal 90 (TL90). En N2 el TL50 fue a los 3.4 días; en N3 se presentó a los 54.7 días y en N4 a los 20 días. El TL90 en ninfas N2 se observó a los 12.9 días; en N3 a los 1521.2 días y en N4 a los 39.3 días (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de TL50 y TL90 de *Isaria fumosorosea* en N2, N3 y N4 de *Meccus pallidipennis*.

Especie	Aislado	Estadio ninfal	TL50 (días)	Límite inf / sup TL50 (días)	TL90 (días)	Límite inf / sup TL90 (días)	Heterogeneidad	χ^2
<i>I. fumosorosea</i>	EH-511/3	N2	3.4	3.1-3.8	12.9	11.9-14.1	0.57	16.1
		N3	54.7	41.9-80.2	1521.2	683.7-5038.7	0.25	7.0
		N4	20.0	19.4-20.7	39.3	136.6-42.8	0.70	19.8

n= 75; Grados de libertad 28

***M. anisopliae* (EH-473/4)**

La presencia de hifas en el cuerpo del insecto se observó el segundo día en N2 y N4 y al tercer día en N3 (Fig. 19).

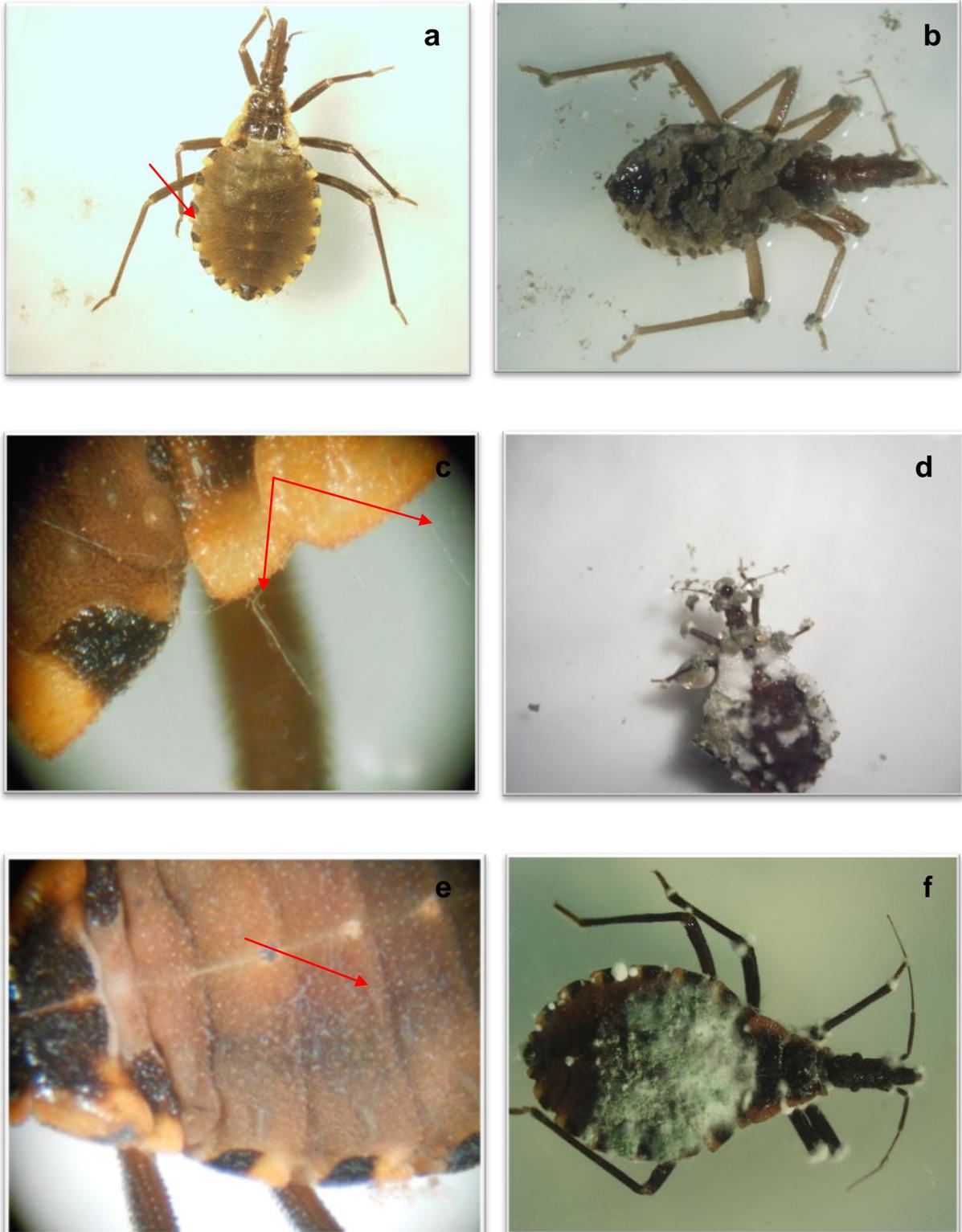


Figura 19. Infección de ninfas de *Meccus pallidipennis* por *Metarhizium anisopliae* EH-473/4. a y b) Infección en N2 que muestra la presencia de las primeras hifas al segundo día (fecha roja) y la esporulación del hongo sobre el cuerpo del insecto. c) y d) Infección en N3 que muestra las primeras hifas al tercer día (fecha roja) y esporulación del hongo en todo el insecto. e) y f) Infección en N4 que muestra las primeras hifas a los 3 días (fecha roja) y la esporulación del hongo en todo el cuerpo del insecto.

La mortalidad en ninfas de *M. pallidipennis*, después de la infección con *M. anisopliae* fue del 100 % en todos los estadios; al séptimo día en N2, y al octavo día en N3 y N4. La mortalidad del 50% de los insectos se obtuvo al cuarto día después de la infección en los estadios N2, N3 y N4 (Tabla 4).

Tabla 4. Mortalidad acumulada en N2, N3 y N4 de *Meccus pallidipennis* infectados con *Metarhizium anisopliae* (EH-473/4).

Día	% de MA N2	% de MA N3	% MA N4	Día	% de MA N2	% de MA N3	% MA N4
1	3	1	4	5	81	64	83
2	8	11	11	6	97	84	88
3	15	17	39	7	100	93	97
4	63	47	73	8		100	100

n= 75; % MA= porcentaje de mortalidad acumulada

Mediante el análisis de Probit, la curva de % MA en el estadio N2, fue de 50% de los insectos a los 3.6 días posteriores a la infección y del 100% a los siete días. En N3 fue a los 3.9 días y el 100 % al día 8. En N4, fue en el día 3.2 y el 100% a los 8 días (Fig. 20, 21 y 22).

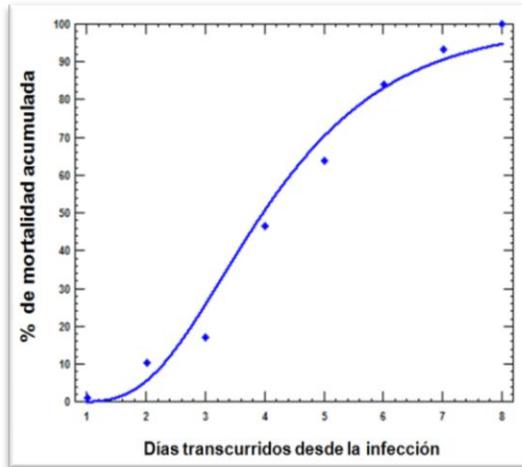


Figura 20. Mortalidad acumulada de N2 de *Meccus pallidipennis* infectadas con 1×10^7 conidios/ mL de *Metarhizium anisopliae*.

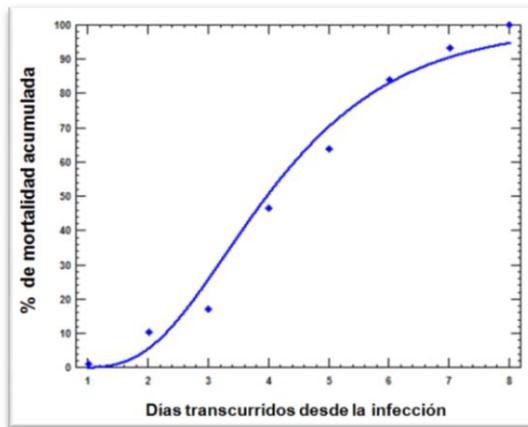


Figura 21. Mortalidad acumulada de N3 de *Meccus pallidipennis* infectadas con 1×10^7 conidios/ mL de *Metarhizium anisopliae*.

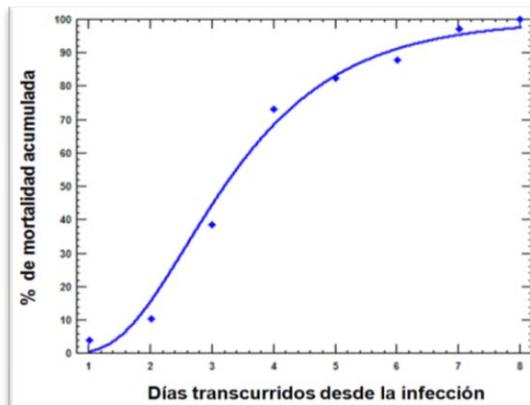


Figura 22. Mortalidad acumulada de N4 de *Meccus pallidipennis* infectadas con 1×10^7 conidios/ mL de *Metarhizium anisopliae*.

El TL50 en N2, se observó a los 3.4 días, en N3 a los 3.9 días y en N4 a los 3.1 días. El TL90 en N2 se presentó a los 5.3 días; en N3 a los 6.8 días y en N4 a los 5.7 días (Tabla 5).

Tabla 5. Mortalidad acumulada en N2, N3 y N4 de *Meccus pallidipennis* infectados con *Metarhizium anisopliae* (EH-473/4).

Especie	Aislado	Estadio ninfal	TL50 (días)	Límite inf /sup TL50 (días)	TL90 (días)	Límite inf /sup TL90 (días)	Heterogeneidad	X ²
<i>M. anisopliae</i>	EH-473/4	N2	3.8	3.2-4.2	5.3	4.7-7.0	2.6	12.7
		N3	3.9	3.4-4.4	6.8	5.9-8.8	4.8	29.0
		N4	3.1	2.7-3.5	5.7	5.0-7.0	3.3	19.8

n=75; Grados de libertad 28

Mediante un ANOVA se identificaron las diferencias significativas entre las medias del porcentaje de mortalidad en ninfas N2, N3 y N4 infectadas con *Isaria fumosorosea* y *M. anisopliae*, en los 5 y 6 días posteriores a la infección.

Al día 5 y 6 con el hongo *I. fumosorosea* se presentaron diferencias significativas en todos los estadios ($P = 0.007$; $F = 30.88$, $P = 0.006$; $F = 32.78$) (Fig. 23).

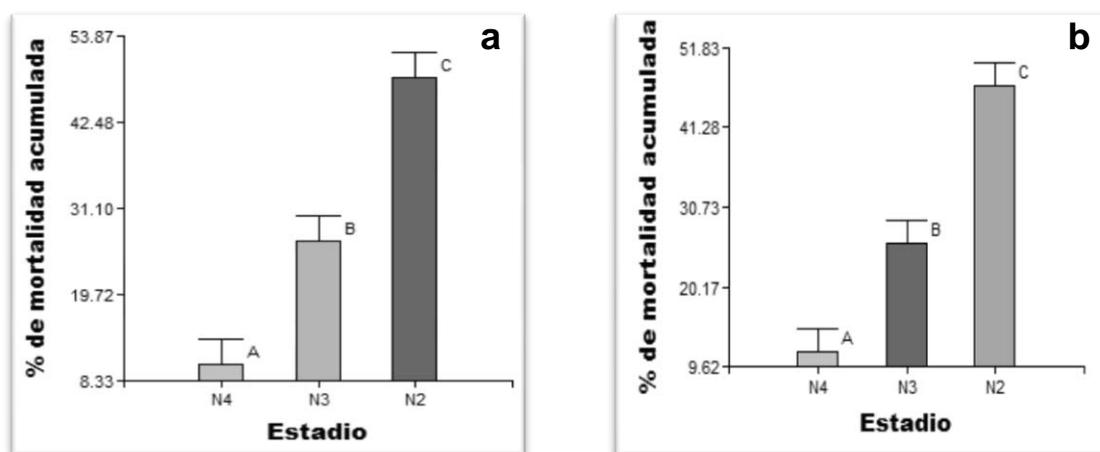


Figura 23. . Efecto de *Isaria fumosorosea* en ninfas N2, N3 y N4 de *Meccus pallidipennis* a los 5 y 6 días posteriores a la infección. a) Diferencias significativas entre los estadios N2, N3 y N4 al quinto día de infección. b) Diferencias significativas entre los estadios N2, N3 y N4 al sexto día de infección. Los tratamientos con letra distinta (A, B, C) son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

En cambio, al día 5 y 6 con el hongo *M. anisopliae* no se presentaron diferencias significativas entre los estadios ($P= 0.3020$; $F= 1.47$, $P= 0.6355$; $F= 0.49$) (Fig. 24).

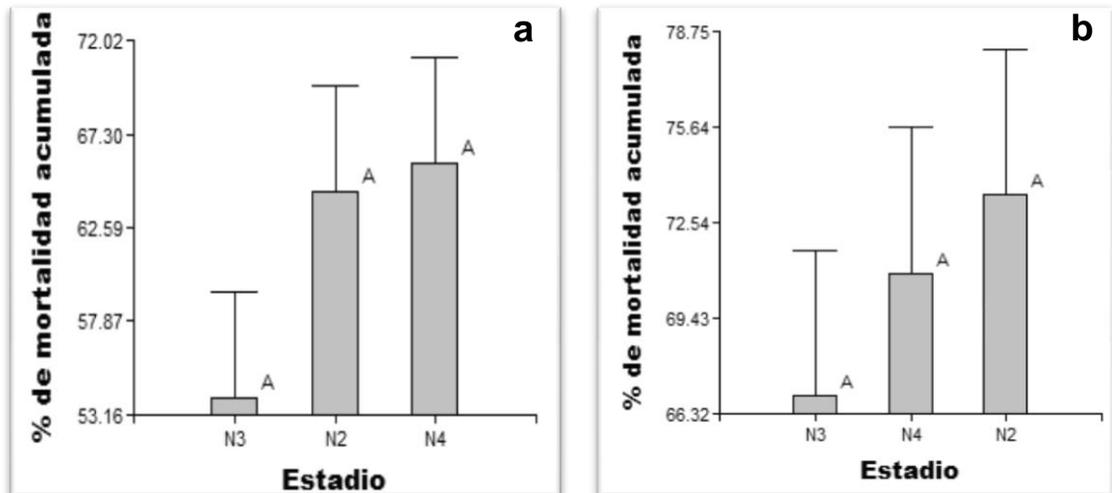


Figura 24. Efecto de *Metarhizium anisopliae* en ninfas N2, N3 y N4 de *Meccus pallidipennis* a los 5 (a) y 6 (b) días posteriores a la infección. No hay diferencias significativas entre estadios. Los tratamientos con letras iguales no son significativamente diferentes (A, A, A).

Asimismo, el análisis ANOVA mostró diferencias significativas en cuanto a la mortalidad de las ninfas entre ambos hongos al día 5 y 6 posterior a la infección ($P= 0.0037$; $F= 9.25$, $P= 0.0034$; $F= 9.47$) (Fig. 25 y 26).

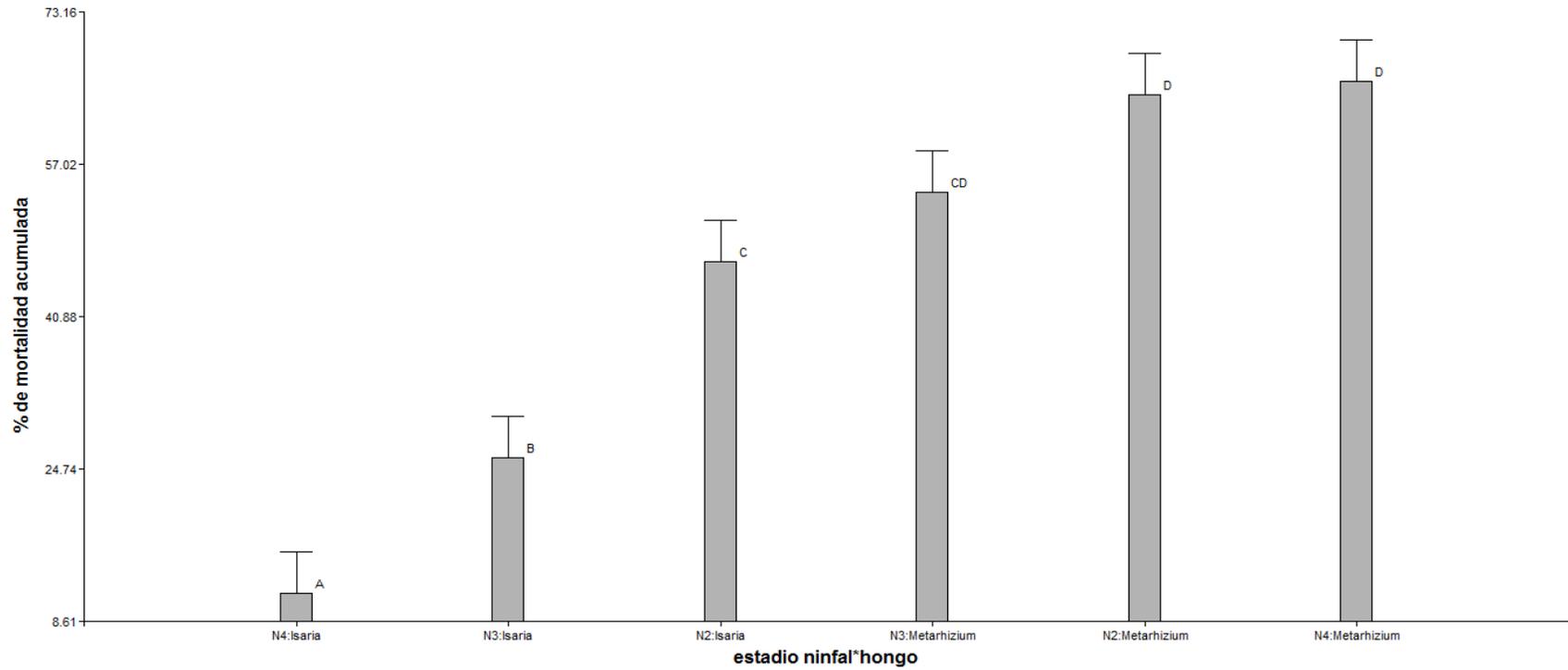


Figura 25. Análisis del porcentaje de mortalidad de *M. pallidipennis* N2, N3 y N4 por la infección con *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae* al quinto día. Las diferencias significativas entre los tratamientos están representadas con letras distintas (A, B, C, D) ($P \leq 0.05$).

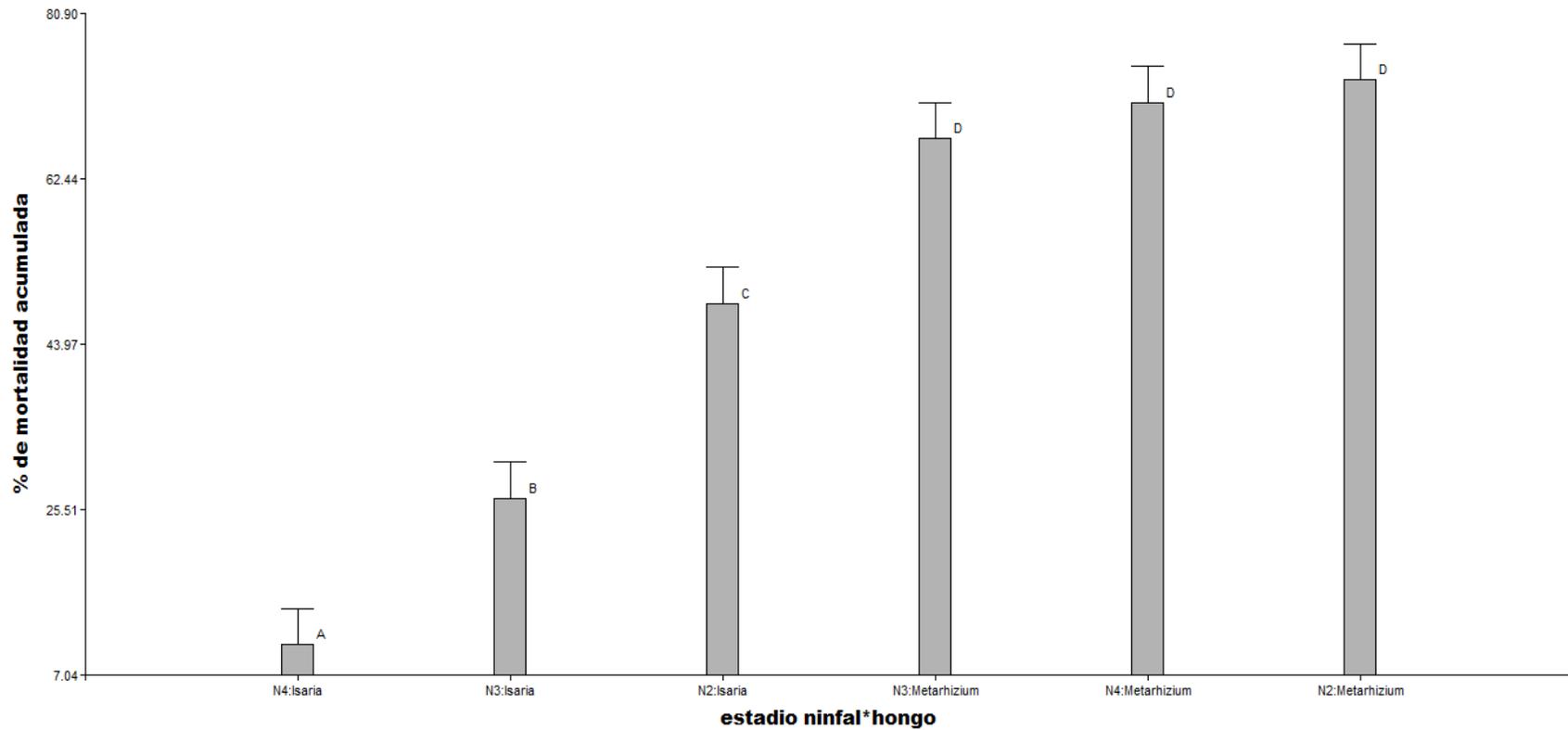


Figura 26. Análisis del porcentaje de mortalidad acumulada de *M. pallidipennis* N2, N3 y N4 por la infección con *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* al sexto día de la infección. Las diferencias significativas entre los tratamientos están representadas con letras distintas (A, B, C, D) ($P \leq 0.05$).

Identificación de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* mediante las sondas moleculares específicas

Especificidad de la sonda de *I. fumosorosea*

Se identificó la banda de 103 pb específica de *I. fumosorosea* en el carril 2 (DNA de *I. fumosorosea* EH-511/3) y carril 3 (DNA de triatómino N4 infectado con *I. fumosorosea*). En otras especies cercanas a *I. fumosorosea* (*P. carneus* y *P. farinosus*) y en *M. anisopliae*, no se observa la banda específica (Fig. 27).

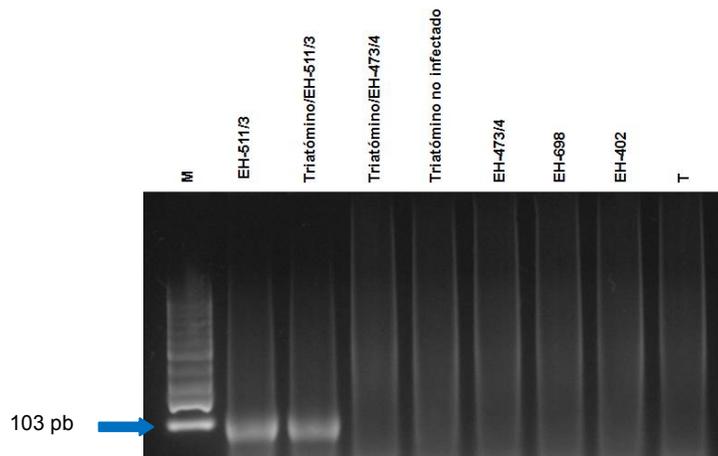


Figura 27. Especificidad de la sonda de DNA de *I. fumosorosea*. Carril 1: M= marcador de peso molecular de 100 pb DNA ladder; carril 2: DNA de *I. fumosorosea* EH-511/3; carril 3: DNA de *M. pallidipennis* infectado con *I. fumosorosea* EH-511/3; carril 4: DNA de *M. pallidipennis* infectado con *M. anisopliae* EH-473/4; carril 5: DNA de *M. pallidipennis* sin infección; carril 6: DNA de *M. anisopliae* EH-473/4; carril 7: DNA de *Paecilomyces carneus* EH-698; carril 8: DNA de *P. farinosus* EH-402; carril 9: T = testigo negativo absoluto (sin DNA). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 90 V, 45 min con 0.3 μ L de Gel Red.

Especificidad de la sonda de *M. anisopliae*

Se observa la banda específica de 188 pb en 4 cepas de *M. anisopliae* (Fig. 28a, carriles 2-5); mientras que en otras especies cercanas al género *Metarhizium* no se observa la banda específica (carril 6y 7). En la Figura 28b se observa la banda de 188 pb en los carriles 2 y 3, que corresponden a DNA de micelio de *M. anisopliae* (EH-473/4) y DNA de un triatómino infectado con *M. anisopliae* (EH-473/4). En el carril 4 con la muestra de DNA de *I. fumosorosea* (EH-511/3), en el carril 5 con DNA de *M.*

pallidipennis sin infección no se observa una banda específica de 188 pb correspondiente a *M. anisopliae*: así como en los testigos negativos absolutos en ambas imágenes (mezcla de reacción sin DNA).

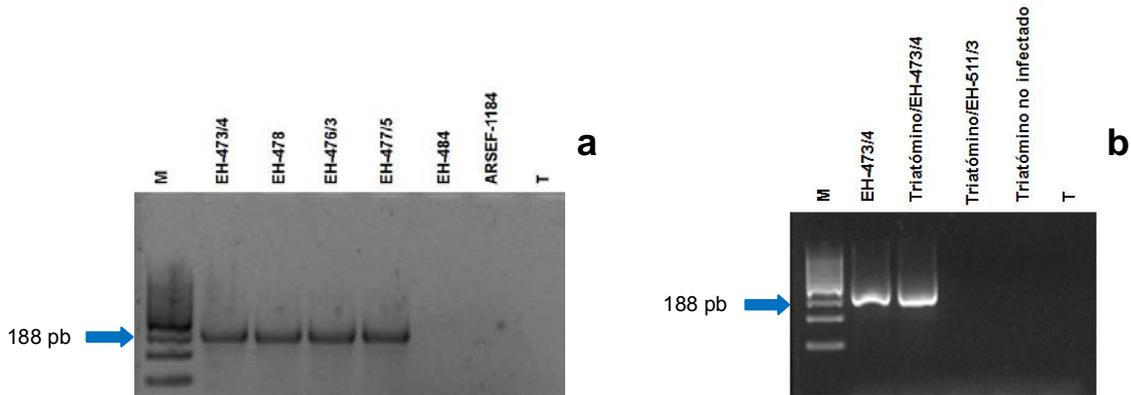


Figura 28. Especificidad de la sonda de DNA de *M. anisopliae*. a) carril 1: M= marcador de peso molecular de 50 pb DNA ladder; carriles 2-5: DNA's de *M. anisopliae*, EH-473/4 (2), EH-478 (3), EH-476/3 (4), EH-477/5 (5); carril 6: DNA de *M. acridum* EH-484; carril 7: DNA de *M. flavoviride* ARSEF-1184; carril 8: T= Testigo negativo absoluto (sin DNA). b) carril 1: M= Marcador de peso molecular de 50 pb DNA ladder; carril 2: DNA de *M. anisopliae* EH-473/4; carril 3: DNA de *M. pallidipennis* infectado con *M. anisopliae* EH-473/4; carril 4: DNA de *M. pallidipennis* infectado con *I. fumosorosea* EH-511/3; carril 5: DNA de *M. pallidipennis* sin infección; carril 6: T= testigo negativo absoluto (sin DNA). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 90 V, 45 min con 0.3 μ L de Gel Red.

Identificación de *M. anisopliae* en ninfas de *M. pallidipennis* infectadas en las trampas cebadas diseñadas en el laboratorio

Todas las ninfas de *M. pallidipennis* que fueron colocadas en las trampas cebadas se infectaron con el hongo. Se observa la banda específica de 188pb correspondiente a *M. anisopliae* en todos los triatóminos recolectados después de 3 días de que se inició el experimento (Fig. 29a carriles 2-12 y Fig. 29b carriles 2-11). Así mismo se observa la banda específica de 188pb correspondiente al testigo positivo (DNA de micelio de *M. anisopliae* EH-473/4) y no se observa en el testigo negativo absoluto (mezcla de reacción de PCR sin DNA).

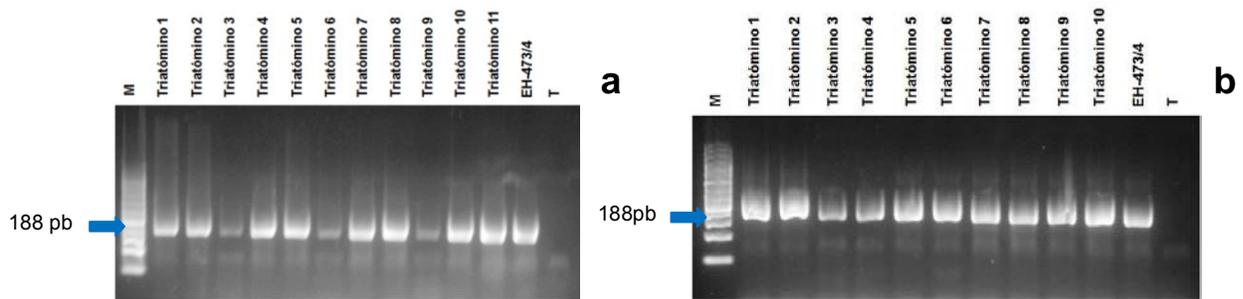


Figura 29. Identificación de *M. anisopliae* en la infección de ninfas N5 de *M. pallidipennis* en las trampas cebadas del laboratorio. a) carril 1: M= marcador de peso molecular de 50 pb DNA ladder; carril 2-12: DNA de triatóminos recolectados de la trampa cebada a los tres días; carril 13: DNA de *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 14: T= testigo negativo absoluto (sin DNA). b) carril 1: M= marcador de peso molecular de 50 pb DNA ladder; carril 2-11: DNA de triatóminos recolectados de la trampa cebada a los tres días; carril 12: DNA de *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 13: T= testigo negativo absoluto (sin DNA). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 90 V, 45 min con 0.3 μ L de Gel Red.

Trabajo de campo

Etapa 1: Búsqueda de cepas silvestres de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* en triatóminos recolectados en Anenecuilco, Morelos antes de la aspersion del hongo

Durante la etapa 1 se recolectaron 18 especímenes de *M. pallidipennis* en los cuales no se identificaron cepas silvestres de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* con las sondas de DNA específicas de 103 pb (Fig. 30, carriles 2-17) y de 188 pb (Fig. 31a, carriles 2-10 y 31b, carriles 2-10), respectivamente. En las figuras 30 y 31 se observan las bandas correspondientes a los testigos positivos (DNA de micelio de *M. anisopliae* y DNA de triatómino infectado con *I. fumosorosea* o *M. anisopliae* en el laboratorio); así mismo no se observa ninguna banda en el testigo negativo absoluto en ambas imágenes (sin DNA).

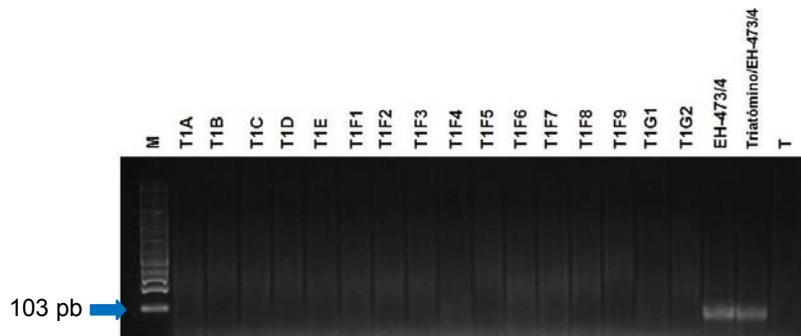


Figura 30. Identificación de cepas silvestres de *I. fumosorosea* en triatóminos de *M. pallidipennis* recolectados antes de la aplicación del hongo en Anenecuilco, Morelos. Carril 1: M= marcador de peso molecular de 100 pb DNA ladder; carril 2-17: triatóminos T1A-T1G2 datos de recolecta e identificación de infección con *T. cruzi* (ver anexo 1); carril 18: DNA de *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 19: DNA de *M. pallidipennis* infectado con *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 20: T= testigo negativo absoluto (sin DNA). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% a 90V, 45 min con 0.3µL de Gel Red.

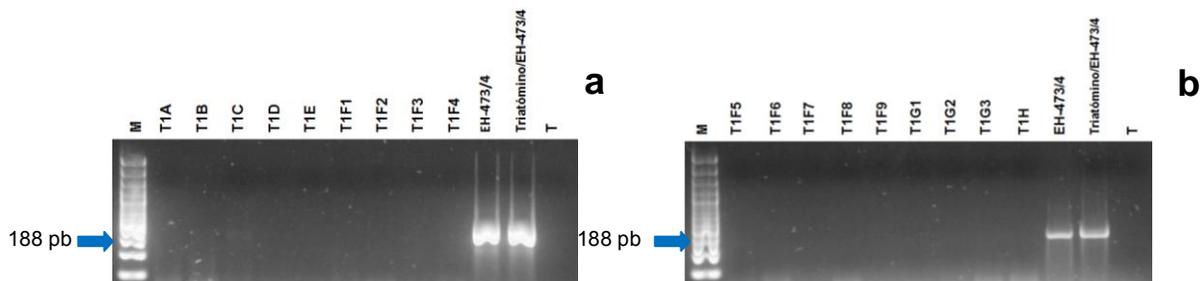


Figura 31. Identificación de cepas silvestres de *M. anisopliae* en triatóminos de *M. pallidipennis* recolectados antes de la aplicación del hongo en Anenecuilco, Morelos. a) Carril 1: M= marcador de peso molecular de 50 pb DNA ladder; carril 2-10: triatóminos T1A-T1F4*; carril 11: DNA de *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 12: DNA de *M. pallidipennis* infectado con *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 13: T= testigo negativo absoluto (sin DNA). b) Carril 1: M= marcador de peso molecular de 50 pb DNA ladder; carril 2-10: triatóminos T1F5-T1H*; carril 11: DNA de *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 12: DNA de *M. pallidipennis* infectado con *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 13: T= testigo negativo absoluto (sin DNA). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% a 90V, 45 min con 0.3µL de Gel Red. *Datos de recolecta e identificación de infección con *T. cruzi* ver anexo 1.

Selección del hongo entomopatógeno para su aplicación en la localidad seleccionada

El hongo que se aplicó en la localidad seleccionada fue *M. anisopliae*; ya que los resultados del tiempo letal medio en ninfas N2, N3 y N4 de *M. pallidipennis*, mostró una mayor virulencia en el insecto que *I. fumosorosea*.

Etapa 2: Detección de *M. anisopliae* en triatóminos recolectados posterior a la primera aplicación del hongo

En la etapa 2 se recolectaron 23 triatóminos en las viviendas que fueron asperjadas en la periferia con *M. anisopliae*. En la PCR que se realizó con el DNA de los triatóminos recolectados a los 7 y 30 días después de la aplicación del hongo no se observó la banda específica de 188 pb (Figs. 34a y 34b). En la figura 34a los carriles 2-8 corresponden a los triatóminos recolectados a los 7 días. Los carriles 9-12 de la figura 32a; así como los carriles 2-13 de la figura 32b corresponden a los triatóminos recolectados a los 30 días de la aplicación del bioinsecticida. Se observa en ambas figuras las bandas de 188 pb correspondientes a los testigos positivos (DNA de micelio de *M. anisopliae* y DNA de triatómino infectado con *M. anisopliae* en el laboratorio), mientras que en el testigo negativo absoluto (sin DNA) no se observa la banda correspondiente al marcador molecular de *M. anisopliae*.

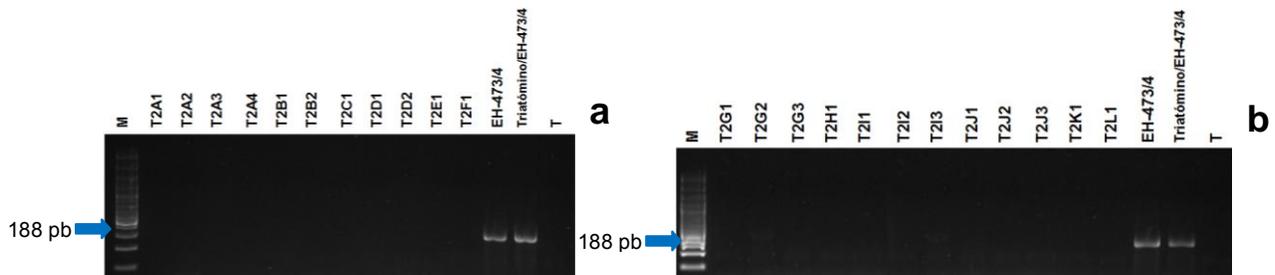


Figura 32. Identificación de *Metarhizium anisopliae* en triatóminos de *M. pallidipennis* recolectados después de la primera aspersión del hongo (a la semana y al mes de la aplicación). a) carril 1: M= marcador de peso molecular de 50 pb DNA ladder; carril 2-8: triatóminos T2A1-T2C1* recolectados a la semana; carriles 9-12: triatóminos T2D1-T2F1* recolectados al mes; 13: DNA de *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 14: DNA de *M. pallidipennis* infectado con *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 15: T= testigo negativo absoluto (sin DNA). b) carril 1: M= marcador de peso molecular de 50 pb DNA ladder; carril 2-13: triatóminos T2G1-T2L1* recolectados al mes; carril 14: DNA de *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 15: DNA de *M. pallidipennis* infectado con *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 16: T= testigo negativo absoluto (sin DNA). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 90 V, 45 min con 0.3 µL de Gel Red. *Datos de recolecta e identificación de infección con *T. cruzi* ver anexo 1.

Etapa 3: Detección de *M. anisopliae* en triatóminos recolectados posterior a la segunda aplicación

Se recolectaron 27 triatóminos durante la etapa 3. En la PCR realizada con la sonda de DNA específica y el DNA de los triatóminos, no se identificó la presencia de *M. anisopliae* en 6 insectos recolectados a los 7 días después de la aplicación del hongo (Fig. 33a, carriles 2-7). Los carriles 8-12 de la figura 32a y 2-17 de la figura 32b corresponden a los triatóminos recolectados a los 30 días de la aplicación de *M. anisopliae*; en el carril 7 de la figura 32b se observa una banda de 188 pb que corresponde a una hembra de *M. pallidipennis* infectada con *M. anisopliae*, que fue recolectada en una vivienda de la zona centro de Anenecuilco. En el resto de los triatóminos recolectados, no se logró identificar la banda de 188 pb (Fig. 33a, carriles 8-12; 33b, carriles 2-6 y 8-17).

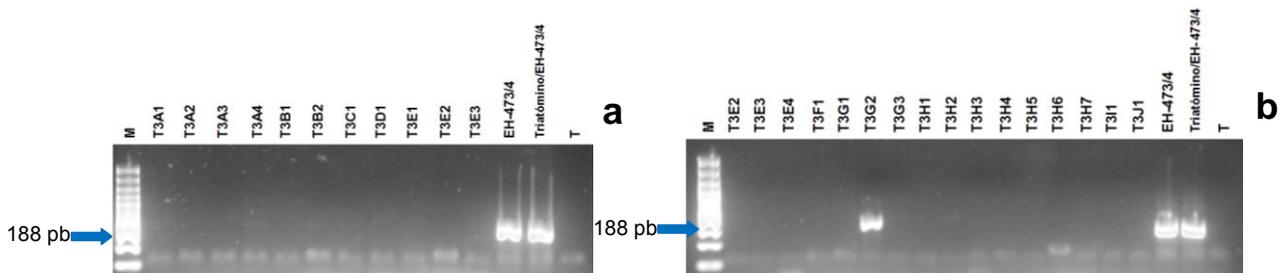


Figura 33. Identificación de *Metarhizium anisopliae* en triatóminos de *M. pallidipennis* recolectados después de la segunda aspersión del hongo (a la semana y al mes de la aplicación). a) carril 1: M= marcador de peso molecular de 50 pb DNA ladder; carril 2-7: triatóminos T3A1-T3B2* recolectados a la semana; carril 8-12: triatóminos T3C1-T3E3* recolectados al mes; carril 13: DNA de *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 14: DNA de *M. pallidipennis* infectado con *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 15: testigo absoluto (sin DNA). b) carril 1: M= marcador de peso molecular de 50 pb DNA ladder; carril 2-17: triatóminos T3E2-T3J1* recolectados al mes; carril 7: banda de 188 pb de triatómino recolectado a los 30 días; carril 18: DNA de *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 19: DNA de *M. pallidipennis* infectado con *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 20: testigo negativo (sin DNA). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 90 V, 45 min con 0.3 μ L de Gel Red. *Datos de recolecta e identificación de infección con *T. cruzi* ver anexo 1.

Etapa 4: Detección de *M. anisopliae* en triatóminos recolectados posterior a la colocación de las trampas cebadas en las viviendas seleccionadas

Se recolectaron 5 triatóminos 7 días después de que se colocaron las trampas cebadas con ratón en las viviendas seleccionadas. En la figura 34 se observa el

crecimiento de micelio en el cuerpo de una de las hembras adultas de *M. pallidipennis* recolectadas, posteriormente se identificó el hongo *M. anisopliae* mediante un examen microscópico de sus características específicas, tomando una muestra directamente del insecto.



Figura 34. Crecimiento fúngico de *Metarhizium anisopliae* en una hembra de *Meccus pallidipennis*, sembrados en agar-agua a los 15 días de la recolecta.

La figura 35 corresponde a la PCR realizada con la sonda específica de 188 pb de *M. anisopliae*. Se observa la presencia de la banda en 4 de los 5 triatóminos recolectados 7 días posteriores a la colocación de las trampas (carriles 2-11). El carril 12 y 13 corresponden a los testigos positivos (DNA de micelio de *M. anisopliae* y un triatómino infectado con *M. anisopliae* en el laboratorio) en el cual se observa la banda de 188 pb; mientras que en el carril 14 no se observa la banda (testigo negativo absoluto).

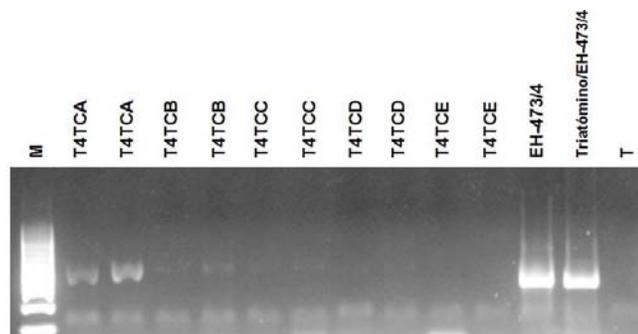


Figura 35. Identificación de *Metarhizium anisopliae* en triatóminos de *M. pallidipennis* recolectados a los siete días de la colocación de las trampas cebadas. Carril 1: M= marcador de peso molecular de 50 pb DNA ladder; carril 2-11: triatóminos T4TCA-T4TCE* por duplicado recolectados a los siete días; carril 12: DNA de *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 13: DNA de *M. pallidipennis* infectado con *M. anisopliae* EH-473/4 (testigo positivo); carril 14: testigo absoluto (sin DNA). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 90 V, 45 min con 0.3 µL de Gel Red. *Datos de recolecta e identificación de infección con *T. cruzi* ver anexo 1.

6. DISCUSIÓN

Al comenzar los estudios de virulencia de *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* en el insecto transmisor de la enfermedad de Chagas, *M. pallidipennis* se observó que el mejor método para infectar los triatóminos durante los bioensayos fue el depósito de la suspensión de conidios sobre el pronoto del insecto. Los bioensayos llevados a cabo con este método nos permitió obtener una dosis bien establecida para el cálculo de la virulencia; ya que los otros métodos (insectos sobre papel filtro con hongo e inmersión) no fueron útiles para obtener la cuantificación precisa de la infección en los triatóminos. Sin embargo otros autores han logrado de forma exitosa la infección con hongos entomopatógenos utilizando los métodos de aspersion, inmersión, depósito de la suspensión conidial en pronoto y caminata sobre papel filtro impregnado con conidios (Rocha y Luz 2011; Flores Villegas 2011, Zumaquero *et al.*, 2014; Vázquez-Martínez *et al.*, 2014).

La virulencia de un microorganismo se puede considerar como la capacidad relativa del mismo para causar daño en un hospedero (Casadevall y Pirofski, 2003). La capacidad de producir daño con las especies fúngicas estudiadas, se midió por el TL50, lo cual considera que entre menos tiempo tarde el hongo en producir la muerte del insecto (menor TL50), la especie es más virulenta. Se observó la mortalidad de todos los triatóminos de los estadios ninfales estudiados al octavo día, cuando éstos fueron infectados con *M. anisopliae*; mientras que con *I. fumosorosea* ni siquiera alcanzó el 100% de mortalidad en los bioensayos con N2, N3 y N4, aún después de 45 días post-infección; esto apoya la mayor virulencia de *M. anisopliae* para los estadios N2, N3 y N4 de *M. pallidipennis*.

Antecedentes publicados revelan algunas discrepancias con nuestros datos; en un trabajo realizado por Rocha y Luz (2011) se infectaron ninfas N3 de *Triatoma infestans* (un importante vector de *T. cruzi* en Sudamérica) con diferentes cepas de *M. anisopliae* y la misma concentración a la utilizada en nuestro trabajo, obteniendo una mortalidad de los triatóminos infectados con las cepas de *M. anisopliae* mostraron un TL50 de 6.5 a 7.0 días, mientras que la cepa EH-473/4 de *M. anisopliae* probada en nuestro trabajo mostró una mayor virulencia contra *M. pallidipennis* (vector

peridomiciliar importante de *T. cruzi* en México) con un TL50 de 3.1-3.9 días. Así mismo, estos investigadores (Rocha *et al.*, 2011) probaron 3 cepas de *I. fumosorosea* contra ninfas N3 de *T. infestans* y obtuvieron un TL50 entre 10 y 17 días. En contraste, la cepa EH-511/3 de *I. fumosorosea* probada en este trabajo resultó menos virulenta contra ninfas N2, N3 y N4 de *M. pallidipennis* con un TL50 entre 3.5 y 54 días, además de que con este último hongo no se obtuvo el 100% de mortalidad de las ninfas durante 45 días que duró la observación.

La concentración del hongo que se empleó en este trabajo se determinó con base en trabajos previos de nuestros laboratorios, los cuales utilizan la misma dosis para la determinación de la CL50 en huevos de *M. pallidipennis* (Flores-Villegas 2011). Por otro lado, Zumaquero *et al.* (2014) probaron el hongo *B. bassiana* en ninfas N5 de *M. pallidipennis*, en las que determinaron la concentración letal media (CL50). La concentración que mata al 90% de los insectos que obtuvieron fue de 1.71×10^7 esporas/mL muy similar a la nuestra pero con *I. fumosorosea* y *M. anisopliae*.

Los resultados obtenidos en este trabajo en ninfas de triatóminos infectados con *I. fumosorosea* o *M. anisopliae* mostraron diferencias significativas en la mortalidad ($p \leq 0.05$) entre ambos. En trabajos previos (Flores, 2011) con las mismas cepas fúngicas e infectando huevos de *M. pallidipennis*, no se observaron diferencias significativas entre la mortalidad con *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* (92 y 88 %, respectivamente), ambos hongos mataron al embrión del triatómino en poco de tiempo (2.77 y 3.18 días, respectivamente). Estos resultados sugieren que estadio de huevo es más susceptible a la infección fúngica que el estadio de ninfa.

Se observó que en la infección con *M. anisopliae*, los estadios ninfales del triatómino, no son un factor que influya en la mortalidad de éstos; ya que no se observaron diferencias significativas entre los estadios N2, N3 y N4.

Melgar *et al.*, (2004), probaron 2 cepas de *M. anisopliae* en ninfas 1 de *Triatoma dimidiata* y concentración de 1×10^7 conidios/ mL, que fue la misma que empleamos en nuestro trabajo. El TL50 que obtuvieron fue mayor (5.5 y 6.6) que el que obtuvimos nosotros con la cepa de *M. anisopliae* EH-473/4 (3.1-3.9 días), lo que sugiere una mayor virulencia de nuestra cepa para triatóminos.

La diferencia entre los dos hongos empleados en este trabajo en ninfas de *M. pallidipennis* fue evidente, ya que la cepa EH-473/4 de *M. anisopliae* mostró un TL50 menor con respecto a la cepa EH-511/3 en todos los estadios ninfales. Por consiguiente, esta hongo fue el que se utilizó para la aplicación en el peridomicilio de las casas seleccionadas en la comunidad en estudio, ubicada en el estado de Morelos considerado como estado endémico para la enfermedad de Chagas, ya que se evidenció en la comunidad la presencia de *M. pallidipennis* infectados con *T. cruzi*. Este dato coincide con el informe de la Secretaría de Salud (SUIVE/DGE) de México (2015) donde se indica una incidencia de la enfermedad de Chagas en 14 de los 33 municipios de Morelos, siendo los que presentan la mayor tasa de casos los municipios de Cuernavaca, Ayala (Anenecuilco), Temixco y Cuautla.

No se identificaron cepas silvestres de los hongos entomopatógenos, *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* en insectos recolectados en la localidad previo a la aplicación de *M. anisopliae* (etapa 1), para la detección de aislados nativos de *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* en triatóminos. En este trabajo se utilizaron sondas moleculares desarrolladas por Arroyo (2007) y Brunner (2012), las cuales resultaron ser altamente sensibles, ya que detectan hasta 500 fg/ μ L de DNA fúngico, además de que se pudo corroborar que son altamente específicas para las cepas empleadas en este trabajo. Luz *et al.*, 2004 realizaron la identificación de 31 cepas silvestres de *M. anisopliae* y 15 de *B. bassiana*, utilizando muestras de tierra y heces recolectadas en el peridomicilio de viviendas en una zona endémica de *Triatoma infestans*. Marti *et al.*, (2006), realizaron aislamientos de *B. bassiana* y *Paecilomyces* (\equiv *Isaria*) *lilacinus* en *T. infestans* mediante características macro y micromorfológicas, y estudios de virulencia en triatóminos. Las características morfológicas, fisiológicas y biológicas, no son altamente específicas como los marcadores moleculares utilizados en este trabajo.

Posterior a la aplicación de *M. anisopliae* (etapa 2) se recuperaron 23 insectos, y en la determinación de la infección con el hongo mediante la sonda de 188 pb, los resultados fueron negativos. En la segunda aplicación (etapa 3), mediante el reconocimiento de la sonda específica para identificar la infección con el hongo, solo se identificó un triatómino infectado de 25 ejemplares recolectados. En la tercera aplicación (etapa 4), se identificó la presencia de *M. anisopliae* (sonda de 188 pb) en

los 4 de los 5 triatóminos recolectados a los siete días posterior a la aplicación de hongo. Aún cuando el número de triatóminos no es amplio, se identificó la infección con *M. anisopliae* mediante el uso de marcadores moleculares, después de ser aplicado en el campo.

Los estudios en campo son escasos, Luz *et al.* (1999), realizaron un trabajo en cuatro viviendas con características específicas y condiciones controladas en las que se asperjaron conidios de *B. bassiana* en muros de una vivienda construida para el efecto. Posteriormente introdujeron ninfas N3 de *T. infestans* y colocaron cajas con ninfas infectadas previamente con el hongo y papel filtro impregnado con la suspensión conidial. La recuperación de insectos fue baja en comparación con la casa testigo, la persistencia del hongo en el papel filtro colocado dentro de las casas fue elevada, el número de insectos recolectados después de 25 días fue bajo. La recuperación de insectos fue muy similar a la de nuestro trabajo en que no se pudieron obtener más especímenes.

Forlani *et al.* (2015) realizaron un estudio en el que se utilizó un formulado de *B. bassiana* y feromonas de triatóminos para aplicar en cajas de cartón, las cuales se colocaron en viviendas rurales en donde previamente se había reportado la presencia de *T. infestans*. Los triatóminos que se recolectaron vivos y muertos dentro de las cajas después de 20 días, se mantuvieron en el laboratorio para analizar y verificar la infección fúngica. La mortalidad fue más elevada con la formulación con feromonas que la que contenía solo el hongo. En la cuarta etapa de nuestro trabajo se utilizaron trampas con ratones para atraer a los triatóminos, lo que redundó en la detección molecular de *M. anisopliae* en 4 de 5 triatóminos recolectados. Esto sugiere la posibilidad de incluir un atrayente de triatóminos para lograr una infección exitosa de los insectos.

Por último, los hongos entomopatógenos *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* utilizados en este trabajo, han sido objeto de diversos protocolos de bioseguridad (Mier *et al.*, 2005; Toriello *et al.*, 2006, 2009), necesarios para la aplicación de estos formulados como bioinsecticidas en el campo y diversas localidades. En especies ampliamente utilizadas como *B. bassiana* se han reportado respuestas de tipo alérgico, por lo que se hace necesario ampliar estudios para determinar la severidad

de las reacciones alérgicas y otros efectos colaterales ante la exposición de hongos entomopatógenos para el control biológico (Westwood *et al.*, 2005).

7. CONCLUSIONES

- *M. anisopliae* EH-473/4 mostró una mayor virulencia para ninfas N2, N3 y N4 de *M. pallidipennis* que *I. fumosorosea* EH-511/3.
- *I. fumosorosea* presentó el menor TL50 en ninfas N2 de *M. pallidipennis*
- No se identificaron mediante métodos moleculares, cepas silvestres de *M. anisopliae* en insectos provenientes de la comunidad en estudio.
- Se identificó *M. anisopliae* mediante sonda de DNA en triatóminos recolectados después de la segunda (etapa 3) y tercera aplicación del hongo (etapa 4) en la comunidad, a los 30 y siete días, respectivamente.
- Los resultados obtenidos sugieren a *M. anisopliae* como un buen candidato para el control biológico de *M. pallidipennis*, transmisor de la enfermedad de Chagas.

8. EXPECTATIVAS

- Ampliar los bioensayos de virulencia en ninfas N5 y adultos de *M. pallidipennis* en condiciones de laboratorio.
- Ampliar el número de insectos recolectados en campo e incluir otras muestras para estudios de detección molecular de aislados silvestres de *M. anisopliae*.
- Verificar la infección de *M. anisopliae* en estadios ninfales y adultos de *M. pallidipennis* mediante microscopía fotónica y electrónica.
- Se requiere ampliar investigaciones sobre la formulación, aplicación y evaluación de un posible bioinsecticida con *M. anisopliae* (EH 473/4) en condiciones de campo.

- Ampliar la búsqueda de aislados de hongos entomopatógenos en hábitats donde se ubican los insectos transmisores de *T. cruzi*, con el propósito de caracterizarlos micológica y molecularmente para la búsqueda de un mayor número de candidatos como bioinsecticidas.

9. REFERENCIAS

- Alves RT, Bateman RP, Prior C, Leather SR. 1998. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. *Crop Protection*. 17: 675-79.
- Alvernaz DA, Tai MH, Luz C. 2009. Enhanced ovicidal activity of an oil formulation of the fungus *Metarhizium anisopliae* on the mosquito *Aedes aegypti*. *Medical and Veterinary Entomology*. 23:141-147.
- Ansari AM, Pope EC, Carpenter S, Scholte EJ, Butt TM. 2011. Entomopathogenic Fungus Biological Control for an Important Vector of Livestock Disease: The *Culicoides* Biting Midge. *Plos One*. 6: 1-8.
- Arroyo VE. 2007. Obtención de marcadores SCAR a partir de patrones AFLP, para la identificación del hongo *Paecilomyces fumosoroseus*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bhattachary A, Samal AC, Kar S. 2004. Entomophagous fungus in pest management. *News Letter*. 5:12.
- Bautista NL, García-de la Torre GS, Haro-Arteaga I, Salazar-Schettino PM. 1999. Importance of *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) as a vector *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) in the state of Morelos Mexico and possible ecotopes. *Journal Medical Entomology*. 36:233-35.
- Benítez-Alva JI, Téllez-Rendón JL, Huerta H. 2012. Distribución de triatóminos (Heteroptera: Reduviidae) asociados a la vivienda humana y posibles zonas de riesgo en seis estados de la República Mexicana. *BIOCYT* 5: 327-340.
- Bidochka MJ, Melzer MJ. 2000. Genetic polymorphisms in three subtilisin-like protease isoforms (Pr1A, Pr1B and Pr1C) from *Metarhizium* strains. *Canada Journal Microbiology*. 46: 1138-1144.
- Blanford 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.
- Bolckmans K, Sterk G, Eyal J, Sels B, Stepman W. 1995. Preferal, (*Paecilomyces fumosoroseus* strain Apopka 97), a new microbial insecticide for the biological control of whiteflies in greenhouses. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit. Gent*. 60: 713-717.
- Boucias DG, Pendland JC. 1998. Principles of insect pathology. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers. 568pp.
- Brener Z. 1971. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto Medicina de Tropical Sao Paulo*. 13: 171-78.
- Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, Maccarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J. 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and veterinary entomology*. 17: 87-94.
- Brunner Mendoza Carolina Angélica. 2012. Obtención de un marcador molecular para la identificación del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Boomsma JJ, Jensen AB, Meyling NV, Eilenberg. 2014. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. *Annual Review Entomology*. 59: 467-485.
- Butt TM, Jackson C, Magan N. 2001. Introduction –Fungal Biological Control Agents: Progress, Problems and Potential. In: *Fungi as Biocontrol Agents*. Butt TM, Jackson C, Magan N. (Eds.). CABI Publishing, Wallingford. pp. 1-8.
- Casadevall A, Pirofski L. 2003. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nature Review Microbiology*. 1: 17-24.
- Castellanos MJ, González BM, Reyes MM, Mier T, Aranda E, 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). *Revista Iberoamericana de Micología*. 24: 62-68.
- Castellanos MJ Cruz CR, Aranda E, Mier T, Toriello C. 2008. Relationship between protease and chitinase activity and the virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* in *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) *Revista Mexicana de Micología*. 28: 71-80.
- Charnley AK, Collins SA. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. En *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships*, 2a edición. pp. 157-187.
- Chester-Beaver P, Clifton-Jung, R, Wayne-Cupp E. 2003. *Parasitología Clínica de Craig Faust*. México, D.F., Masson Doyma. 93-102.
- Choo HY, Rice WC. 2007. Evaluation of microbial agents against rice pests. In: *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Lawrence AL, Kaya HK (Eds.) Springer, The Netherlands. pp. 393-409.
- Cimo PL, Luper WE, Scouros MA. 1993. Transfusion-associated Chagas disease in Texas: report of a case. *Texas Med Clinic*. 89: 48-50.
- Clarkson JM, Charnley AK. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Journal Trends in Microbiology*. 4: 197-203.
- Cruz-Reyes A, Pickering-López JM. 2006. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years. *A review Mem Inst Oswaldo Cruz*. 101: 345-354.

- Dimbi S, Maniania NK, Lux SA, Mueke JM. 2004. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *Journal BiolControl*. 49:83-94.
- Flores-Villegas Any Laura. 2011. Evaluación de *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de *Meccus pallidipennis* en condiciones de laboratorio. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Flores-Villegas AL, Cabrera-Bravo M, Rojas-Wastavino G, Pérez-Torres A, Vences-Blanco MO, Navarro-Barranco H, Ayala-Zermeño MA, López-Martínez I, Hernández-Velázquez VM, Salazar-Schettino PM, Toriello C. 2012. Bioensayos de *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) y *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) en *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) transmisor de la enfermedad de Chagas. *Memorias de Control Biológico*, Puebla.
- Forlani L, Pedrini N, Girotti JR, Mijailovsky SJ, Cardozo M, Gentile AG, Hernández-Suárez CM, Ravinovich JE, Juárez MP. 2015. Biological control of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* combined with an aggregation cue: field, laboratory and mathematical modeling assessment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 5: e0003778. Doi:10.1371/journal.pntd.0003778.
- Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, 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.
- Greif MD, Currah RS. 2007. Patterns in the Occurrence of Saprophytic Fungi Carried by Arthropods Caught in Traps Baited with Rotted Wood and Dung. *Mycologia*. 99: 7-19.
- Guhl F. 2009. Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectiva. *Review of Biomedical*. 20: 228-234.
- Hajek AE, St Leger RJ. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review Entomology*. 39:293-322.
- Haro I, Salazar-Schettino PM, Cabrera M. 1966. Diagnóstico Morfológico de las Parasitosis. 2ª ed. México; 289 pp.
- Harwood R, James M. 1993. *Entomología Médica y Veterinaria*. México, D.F. 139-152.
- Hemingway J, Ranson H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review Entomology*. 45: 371-391.
- Hoare CA, Wallace FG. 1966. Developmental stage of trypanosomatid flagelates: a new terminology. *Nature*. 212: 1385-1389.
- Hunt TR, Moore D, Higgins PM, Prior C. 1994. Effect of sunscreens, irradiance and resting periods on the germination of *Metarhizium flavoviride* conidia. *Entomophaga*. 39:313-322.
- Hunter WB, Avery PB, Pick D, Powell CA. 2011. Broad spectrum potential of *Isaria fumosorosea* against insect pests of citrus. *Florida Entomologist*. 94: 1051-1054.
- Ignoffo CM, Garcia C. 1992. Influence of conidial color on activation of several entomogenous fungi (Hyphomycetes) by simulated sunlight. *Environmental Entomology*. 21: 913-17.
- Inglis PW, Tigano MS. 2006. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS sequences. *Genetics Molecular Biology*. 29: 132-136.
- Jackson CW, Haele JB, Hall RA. 1985. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in 18 isolates of *Verticillium lecanii*. *Annals of Applied Biology*. 106: 39-48.
- Kanzok SM, Jacobs-Lorena M. 2006. Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. *Trend in parasitology*. 22: 1-2.
- Keller S, Zimmermann G. 1989. Mycopathogens of soil insects. En: Wilding N, Collins NM, Hammond PM, Webber JF, editors. *Insect-fungus interactions*. London, UK: Academic Press. pp. 239-270.
- Lacey A, Kaya H. 2007. Introduction to microbial control. En *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. 2ª ed. Edit. Springer. AA Dordrecht, The Netherlands. pp. 1-4.
- Leiby DA, Lenes BA, Tibbals MA, Tames-Olmedo MT. 1999. Prospective evaluation of a patient with *Trypanosoma cruzi* infection transmitted by transfusion. *New England Journal Medicine*. 34:1237-39.
- Lent H, Wygodzinsky P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera:Reduviidae) and their Significance as Vector of Chagas' Disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 163: 142-520.
- Luz C, Silva IG, Magalhaes BP, Cordeiro CM, Tigano MS. 1999. Control of *Triatoma infestans* (Klug) (Reduviidae: Triatominae) with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.: Preliminary assays on formulation and application in the field. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*. 28: 101-110.
- Luz C, Rocha LF, Nery GV. 2004. Detection of entomopathogenic fungi in peridomestic triatomine-infested areas in central Brazil and fungal activity against *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). *Neotropical Entomology*. 33: 783-791.
- Macedo AM, Oliveira RP, Pena SD. 2002. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert Review in Molecular Medicine*. 4: 1-16.
- Marti AG, López LC, Pelizza S, 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, Grant-Guillén Y, Morales-Corona ZY, Haro-Rodríguez S, Ventura-Rodríguez LV, Nogueta-Torres B, Bustos-Saldaña R. 2008. Importance of species of Triatominae (Heteroptera: Reduviidae) in risk of transmission of *Trypanosoma cruzi* in western Mexico. *Journal of Medical Entomology*. 45: 476-82.
- Martínez-Ibarra JA, Grant-Guillén Y, Ventura-Rodríguez LV, Osorio-Pelayo PD, Macías-Amezcuca MD, Meillón-Isáias K, Alejandre-Aguilar R, Rodríguez-Bataz E, Nogueta-Torres B. 2011. Biological and genetic aspects of crosses between species of the genus *Meccus* (Hemiptera: Reduviidae Triatoma). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 3: 293-300.
- Martínez-Ibarra JA, Nogueta-Torres B, Salazar Schettino PM, Vences-Blanco MO, de la Torre-Álvarez FJ, Montañez-Valdez OD. 2014. Differences on biological attributes of three populations of *Meccus pallidipennis* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Vector Borne Diseases*. 1: 22-26.
- Melgar S, Landaverde P, Dardón M, 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, Editorial Limusa. 78-82 pp.
- Mier T, Olivares RG, Navarro BH, Pérez MA, Lorenzana M, Pérez TA, Toriello C. 2005. Acute oral intragastric pathogenicity and toxicity in mice of *Paecilomyces fumosoroseus* isolated from whiteflies. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 88: 103-111.
- Milner RJ, Samson P, Morton R. 2003. Persistence of conidia of *Metarhizium anisopliae* in sugarcane fields: Effect of isolate and formulation on persistence over 3.5 years. *Biocontrol Science and Technology*. 13:507-516.
- Mnyone LL, Ng'habi KR, Mazigo HD, KAtakweba AA, Lyimo IN. 2012. Entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* reduce the survival of *Xenopsylla brasiliensis* larvae (Siphonaptera: Pulicidae). *Journal Parasites and Vectors*. 5: 204.
- Mochi DA, Monteiro AC, Ribeiro MA, Yoshida L. 2010. Entomopathogenic fungal activity against pupae and adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Veterinary Parasitology*. 168: 105-110.
- Moncayo A, Silveira A. 2009. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104:17-30.
- Moore D, Higgins PM, Lomer CJ. 1996. Effects of simulated and natural sunlight on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal and interactions with temperature. *Biocontrol Science and Technology*. 6:63-76.
- Müller-Kögler. 1965. Pilzkrankheiten bei insekten. Berlin. 444 pp.
- Müller-Kögler E, Zimmermann G. 1980. Zur Aufbewahrung entomogener Pilzkulturen. *Entomophaga* 25:301-311.
- Napolitano R, Juárez MP. 1997. Entomopathogenic fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans*. *Archives of Biochemistry Biophysics*. 334: 208-214.
- Norma Oficial Mexicana NOM -062- ZOO- 1999 (Agricultura & Ganadería, 2008) disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/normateca/Normateca/>
- Pal S, St Leger, RJ, Wu, LP, 2007. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry* 282: 8969-8977.
- Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA. 2009. Chagas disease as a foodborne illness. *Journal of Food Protection*. 72: 441-46.
- Polar P, Kairo MT, Moore D, Pegram R, John SA. 2005. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. *Mycopathologia*. 160: 151-157.
- Rangel DE, Braga GU, Anderson AJ, Roberts DW. 2005. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *Journal of Invertebrate Pathology*. 88:116-125.
- Ramsey JM, Schofield CJ. 2003. Control of Chagas disease vectors. *Salud Pública México*. 45:123-8.
- Rassi A, Rassi A Jr, William CL. 2002. Chagas Heart Disease. *Journal Clinic Cardiology*. 23: 883-889.
- Rassi A, Rassi A Jr, Rassi SG. 2009. Doença de Chagas. In: Lopes AC, ed. *Tratado de clínica médica*, 2nd edn. Sao Paulo: Editora Roca. 4123-34.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. 2010. Chagas disease. *Lancet*. 375: 1388-1402.
- Rocha LF, Luz C. 2011. Activity of *Metarhizium* spp. and *Isaria* spp. from the Central Brazilian Cerrado against *Triatoma infestans* nymphs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 105: 417-419.
- Robertson J, Savin N, Russell R. (version 1.0) [Polo Plus: Probit and Logit Analysis]. Berkeley, California. User's guide. Le Ora Software 1-36 pp.
- Rodríguez BE, Nogueta TB, Rosario CR, Martínez IJ, Rosas AJ. 2011. Triatóminos (Hemiptera: Reduviidae) vectores de *Trypanosoma cruzi* Chagas 1909, en el estado de Guerrero, México. *Review Biomedicals* 22: 31-40.
- Salazar-Schettino P, Rojas-Wastavino G, Cabrera-Bravo M, Bucio-Torres M, Martínez-Ibarra J, Monroy-Escobar M, Rodas-Retana A, Guevara-Gómez Y, Vences-Blanco M, Ruiz-Hernandez A, Torres-Gutiérrez E. 2010. A revision of thirteen species of *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas disease in Mexico. *Journal of the Selva Andina Research Society*. 1:57-80.

- Samson RA, Evans HC, Latgé JP. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Berlin Springer-Verlag. pp. 187
- Sandhu SS. 1995. Effect of physical factors on germination of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* conidia. National Academy of Science Letters. 18: 1-5.
- Sandhu SS, Sharma AK, Beniwal V. 2012. Myco-Biocontrol of Insect Pests: Factors Involved, Mechanism, and Regulation. Journal of Pathogens. 2012: 1-10.
- Scholte EJ, Njiru 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 Journal. 2: 29.
- Scholte EJ, Knols BG, Samson RA, Takken W. 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. Journal of Insect Science. 4:19.
- Scholte EJ, Ng'Habi K, Kihonda J, Takken W, Paaijmans K, Abdulla S, Killeen GF, Knols BG. 2005. An entomopathogenic fungus for control of adults African malaria mosquitoes. Science. 308: 1641-1642.
- Scholte EJ, Knols BG, Takken W. 2006. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. Journal of Invertebrate Pathology. 91: 43-49.
- Scholte EJ, Takken W, Knols BG. 2007. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Acta Tropica. 102: 151-158.
- Secretaria de Salud/SUIVE/DGE. 2015
- Shah PA, Douro-Kpindou OK, Sidibe A, Daffe CO, Van der Pauw H, Lomer CJ. 1998. Effects of the sunscreen oxybenzone on field efficacy and persistence of *Metarhizium flavoviride* conidia against *Kraussella amabile* (Orthoptera: Acrididae) in Mali, West Africa. Biocontrol Science and Technology. 8:357-64.
- Shahid A, Rao AQ, Bakhsh A, Husnain T. 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers; new insights into their virulence and pathogenicity. Archives of Biological Sciences. 64: 21-42.
- Shapiro-Ilan D, Cottrell TE, Jackson MA, Wood BW. 2008. Virulence of Hypocreales fungi to pecan aphids (Hemiptera: Aphididae) in the laboratory. Journal of Invertebrate Pathology. 99: 312-317.
- Stauderman K, Pasco A, Aristizábal L, Steven A. 2012. Evaluation of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). Biocontrol Science and Technology. 22: 747-761.
- Steinhaus EA. 1949. Principles of insect pathology. Mac Graw-Hill, New York, USA
- Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung J-M, Luangsa-ard JJ, Shreshtha B, Spatafora JW. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. Studies in Mycology. 57: 5-59.
- Thomas MB, Read AF. 2007. Can fungal biopesticides control malaria?. Nat Rev Microbiol. 5: 377-383.
- Toledo AV, de Remes L, López LC. 2007. Pathogenicity of fungal isolates (Ascomycota: Hypocreales) against *Peregrinus maidis*, *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera: Delphacidae), and *DAIbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae), vectors of corn diseases. Mycopathologia. 163: 225-232.
- Toriello C. 2003. Bioseguridad de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Hyphomycete). Vedralia. 10: 107-113.
- Toriello C., Pérez TA, Burciaga DA, Navarro BH, Pérez MA, Lorenzana JM, Mier T. 2006. Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittlebugs. Ecotoxicology and Environmental Safety. 65: 278-287.
- Toriello C, Montoya SE, Zavala RM, Navarro BH, Basilio HD, Hernández VV, Mier T. 2008. Virulencia y termotolerancia de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae). Revista Mexicana de Micología 28: 57-66.
- Tyler KM, Engman DM. 2003. The life-cycle of *Trypanosoma cruzi*. In: Tyler KM, Miles MA, eds. American trypanosomiasis. World class parasites: vol 7. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers. 1-11.
- US Centers for Disease Control and Prevention. 2006. Chagas disease after organ transplantation-Los Angeles, California. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). 55: 798-800.
- Vänninen I, Tyni-Juslin J, Hokkanen H. 2000. Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Finnish agricultural soils. BioControl Science and Tecnology. 45:201-222.
- Vázquez-Martínez MG, Cirerol-Cruz BE, Torres-Estrada JL, Rodríguez LM, 2014. Potential for entomopathogenic fungi to control *Triatoma dimidiata* (hemiptera: Reduviidae), a vector of Chagas disease in Mexico. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 46: 716-722.
- Vey A, Hoagland R, Butt TM. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. En: Butt TM, Jackson CW, Magan N, editors. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. Wallingsford, UK: CABI International. pp 311-346.
- Vidal C, Fargues J. 2007. Climatic constraints for fungal biopesticides. En: Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management, eds. S. Ekesi and N.K. Maniania, Kerala, India: Research Signpost. pp. 39-55.
- Vilcinskas A, Götz P. 1999. Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. Advances in Parasitology. 43: 267-313.
- Villalba R, Fornes G, Alvarez MA. 1992. Acute Chagas disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report. Clinical Infectious Diseases. 14: 594-95.

- Walstad JD, Anderson RF, Stambaugh WJ. 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 16:221-226.
- Westwood GS, Huang SW, Keyhani NO. 2005. Allergens of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Clinical and Molecular Allergy*. 3:1.
- WHO. 2006. *Pesticides and their Application for the Control of Vectors and Pests of Public Health Importance*, 6th edition.
- Wraight, SP, Carruthers RI, Jaronski ST, Bradley CA, Garza CJ, Galani-Wraight S. 2000. Evaluation of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for Microbial Control of the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control*. 17: 203-217.
- World Health Organization. 2002. Control of Chagas Disease. Technical Report Series. No. 905, Ginebra. 109pp.
- Xiao G, Ying SH, Zheng P, Wang ZL, Zhang S, Xie XQ, Shang Y, St Leger RJ, Zhao GP, Wang C. 2012. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports-Nature*. 2: 483.
- Zárate LG, Zárate RJ. 1985. A checklist of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) of México. *International Journal of Entomology*. 27: 102-127.
- Zhang YJ, Li ZH, Luo ZB, Zhang JQ, Fan YH, Pei Y. 2009. Light stimulates conidiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*. 19: 91-101
- Zheng P, Xia YL, Xiao GH, Xiong CH, Hu X, Zhang SW, Zheng HJ, Huang Y, Zhou Y, Wang SY. 2011. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional chinese medicine. *Genome Biology*. 12:116.
- Zimmermann G. 1982. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 40: 36-40
- Zimmermann G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Journal of Pesticide Science*. 37: 375-379.
- Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*. 17: 879-920.
- Zimmermann, G. (2007a). 'Review on Safety of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*', *Biocontrol Science and Technology*. 17: 553-596.
- 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 Science and Technology*. 18: 865-901.
- Zumaquero RJ, López-Tlacomulco JJ, Rojas GR, Sansinenea E. 2014. Lethal effects of a mexican *Beauveria bassiana* (Balsamo) strain against *Meccus pallidipennis* (Stal). *Brazilian Journal of Microbiology*. 45: 551-557.

10. ANEXO 1: Relación de triatóminos recolectados en Anenecuilco, Morelos

T1= Etapa 1: Búsqueda de cepas silvestres antes de aspersión del hongo						
Fecha de recolecta	Dirección/zona de recolecta	Ejemplar (Ninfa/adulto M/H)	Infección con <i>T. cruzi</i>	Sonda de <i>I. fumosorosea</i> (+/-)	Sonda de <i>M. anisopliae</i> (+/-)	Identificación
14/05/14	Angostura/zona centro	Hembra	+	-	-	T1C
14/05/14	Aldama/zona centro	N5	Muerta	-	-	T1B
14/05/14	Aldama/zona centro	N5	-	-	-	T1A
14/05/14	Angostura/zona centro	Hembra	Muerta	-	-	T1G1
14/05/14	Aldama/zona centro	Hembra	Muerta	-	-	T1G2
14/05/14	Aldama/zona centro	Hembra	Muerta	-	-	T1G3
14/05/14	Aldama/zona centro	Macho	Muerto	-	-	T1F1
14/05/14	Aldama/zona centro	Macho	Muerto	-	-	T1F2
14/05/14	Aldama/zona centro	Macho	Muerto	-	-	T1F3
14/05/14	Aldama/zona centro	Macho	Muerto	-	-	T1F4
14/05/14	Aldama/zona centro	Macho	Muerto	-	-	T1F5
14/05/14	Aldama/zona centro	Macho	Muerto	-	-	T1F6
14/05/14	Aldama/zona centro	Macho	Muerto	-	-	T1F7
14/05/14	Aldama/zona centro	N5	Muerto	-	-	T1F8
14/05/14	Aldama/zona centro	N5	Muerto	-	-	T1F9
14/05/14	Aldama/zona centro	Hembra	Muerta	-	-	T1D
14/05/14	Aldama/zona centro	Macho	Muerto	-	-	T1H
14/05/14	Adolfo Ruíz Cortínez/zona sur	N5	-	-	-	T1E
14/05/14	Angostura/zona centro	Hembra	-	-	-	T1J1
9/06/14	CEBETIS/zona centro	Hembra	+	-	-	T1I1

✚ Total ejemplares: 20 (8 machos, 7 hembras y 5 ninfas (N5))

✚ Infectados con *T. cruzi*: 2 (hembras), 3 no infectados y 15 muertos

✚ + = Positivo a sonda molecular específica de *M. anisopliae*: 0; - = Negativo a sonda molecular específica: 20

✚ + = Positivo a sonda molecular específica de *I. fumosorosea*: 0; - = Negativo a sonda molecular específica: 20

T2= Etapa 2: colocación de trampas atrayentes con heces de <i>M. pallidipennis</i> y aspersión de <i>M. anisopliae</i> (EH473/4)						
Fecha de recolecta	Dirección/zona de recolecta	Ejemplar Ninfa/adulto M/H	Infección con <i>T. cruzi</i> (+/-)	Sonda de <i>M. anisopliae</i> (+/-)	Intervención 1/2/3	Identificación
22/05/14	Unión/zona sur	N4	-	-	3	T2A1
22/05/14	Unión/zona sur	N5	muerto	-	3	T2A2
22/05/14	Adolfo Ruíz Cortinez/zona sur	Hembra	+	-	3	T2B1
22/05/14	Unión/zona sur	N3	+	-	3	T2A3
22/05/14	Adolfo Ruíz Cortinez/zona sur	N5	Muerto	-	3	T2B2
22/05/14	Benito Juárez/zona centro	Hembra	+	-	1	T2C1
22/05/14	Unión/zona sur	N5	+	-	3	T2A4
20/06/14	La luna/zona sur	Hembra	+	-	2	T2D1
20/06/14	La luna/zona sur	N4	-	-	2	T2D2
20/06/14	Benito Juárez/zona centro	N2	-	-	1	T2E1
20/06/14	Las Flores/zona sur	Hembra	-	-	2	T2F1
22/05/14	Las Flores/zona sur	Hembra	Muerta	-	2	T2G1
22/05/14	Las Flores/zona sur	Hembra	Muerta	-	2	T2G2
22/05/14	Las Flores/zona sur	Hembra	Muerta	-	2	T2G3
20/06/14	Las Flores/zona sur	N2	Muerta	-	2	T2H1
20/06/14	Aldama/zona centro	Hembra	+	-	1	T2I1
20/06/14	Aldama/zona centro	N2	-	-	1	T2I2
20/06/14	Aldama/zona centro	N5	-	-	1	T2I3
20/06/14	Benito Juárez/zona centro	Hembra	-	-	1	T2J1
20/06/14	Benito Juárez/zona centro	Macho	-	-	1	T2J2
20/06/14	Benito Juárez/zona centro	N5	+	-	1	T2J3
20/06/14	La luna/zona sur	N5	-	-	2	T2K1
2/07/14	Aldama/zona centro	Hembra	-	-	2	T2L1

- ✚ Las viviendas se dividieron en 3 grupos: Grupo 1= Aplicación de bioinsecticida en la periferia de las viviendas; Grupo 2= Aplicación de bioinsecticida y colocación de trampas atrayentes (con heces de triatóminos); Grupo 3= Control/Tween 80 al 0.5% sin hongo
- ✚ Total ejemplares: 23 (1 macho, 10 hembras y 12 ninfas; N2(3), N3(1), N4(2) y N5(6))
- ✚ Infectados con *T. cruzi*: 4 hembras 1 N5, 1 N3, 10 no infectados y 6 muertos
- ✚ + = Positivos a sonda de *M. anisopliae*; 0; - = Negativo a sonda molecular específica: 23

T3= Etapa 3: 2ª aplicación del hongo <i>M. anisopliae</i> (EH-473/4)						
Fecha de recolecta	Dirección/zona de recolecta	Ejemplar Ninf/a/adulto M/H	Infectado con <i>T. cruzi</i> (+/-)	Sonda de <i>M. anisopliae</i> (+/-)	Intervención 1/2/3	Identificación
2/07/14	La Luna/zona sur	N3	Muerta	-	2	T3A1
2/07/14	La Luna/zona sur	N3	Muerta	-	2	T3A2
2/07/14	La Luna/zona sur	N3	Muerta	-	2	T3A3
2/07/14	La Luna/zona sur	N2	Muerta	-	2	T3A4
2/07/14	Aldama/zona centro	Hembra	-	-	1	T3B1
2/07/14	Aldama/zona centro	N5	-	-	1	T3B2
2/07/14	La Luna/zona sur	Hembra	+	-	2	T3C1
10/08/14	Adolfo Ruíz Cortinez/zona sur	Hembra	Muerta	-	3	T3D1
10/08/14	Unión/zona sur	Hembra	Viva	-	3	T3E1
10/08/14	Unión/zona sur	Macho	Muerto	-	3	T3E2
10/08/14	Unión/zona sur	N5	Muerto	-	3	T3E3
10/08/14	Unión/zona sur	N2	-	-	3	T3E4
10/08/14	Las flores/zona sur	Macho	-	-	2	T3F1
10/08/14	Aldama/zona centro	Hembra	+	-	2	T3G1
10/08/14	Aldama/zona centro	Hembra	-	+	2	T3G2
10/08/14	Aldama/zona centro	N5	-	-	2	T3G3
10/08/14	Benito Juárez/zona centro	Hembra	-	-	1	T3H1
10/08/14	Benito Juárez/zona centro	Hembra	-	-	1	T3H2
10/08/14	Benito Juárez/zona centro	Hembra	-	-	1	T3H3
10/08/14	Benito Juárez/zona centro	Hembra	-	-	1	T3H4
10/08/14	Benito Juárez/zona centro	Hembra	-	-	1	T3H5
10/08/14	Benito Juárez/zona centro	N3	-	-	1	T3H6
10/08/14	Benito Juárez/zona centro	N4	-	-	1	T3H7
10/08/14	Angostura/zona centro	N2	-	-	2	T3I1
10/08/14	Angostura/zona centro	Hembra	+	-	2	T3J1

✚ Total ejemplares: 25 (2 machos, 11 hembras y 12 ninfas (N2(3) N3(4) N4(2) N5(3)))

✚ Infectados con *T. cruzi*: 3 hembras, 15 no infectados y 7 muertos

✚ + = Positivos a sonda de *M. anisopliae*: 1 de Aldama zona centro (T2G2); - = Negativo a sonda molecular específica: 24

T4= Etapa 4: colocación de trampas cebadas con ratón y <i>M. anisopliae</i> (EH-473/4)					
Fecha de recolecta	Dirección/zona de recolecta	Ejemplar Ninf/a/adulto M/H	Infectado con <i>T. cruzi</i> (+/-)	Sonda de <i>M. anisopliae</i> (+/-)	Identificación
31/10/14	La luna/zona sur	Hembra	NR	+	T4TCA
31/10/14	La luna/zona sur	Hembra	+	+	T4TCB
31/10/14	Unión/zona sur	Hembra	-	+	T4TCC
31/10/14	Unión/zona sur	Hembra	-	-	T4TCD
31/10/14	Unión/zona sur	N5	NR	-	T4TCE

✚ Total ejemplares: 5 (4 hembras y 1 ninfa (N5))

✚ Infectados con *T. cruzi*: 1 hembra, 2 no infectados y 2 no pudieron ser revisados (NR)

✚ + = Positivos a sonda de *M. anisopliae*: 4; - = Negativo a sonda molecular específica: 1