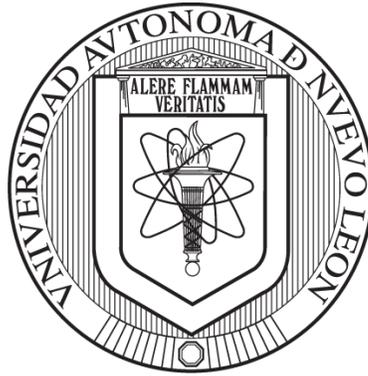


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO ENTOMOPATÓGENO DE *Verticillium lecanii*,  
*Hirsutella thompsonii* y *Beauveria bassiana* (Hypocreaceae,  
Ascomycota), COMO BIOCONTROL DE *Triatoma infestans*  
(Klug 1834) (HEMIPTERA: REDUVIIDAE)**

**POR**

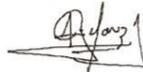
**Q.B.P Ana Karen Leal Olvera**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
DE Maestría en Ciencias con orientación en  
Microbiología.**

**2021**

**EFFECTO ENTOMOPATÓGENO DE *Verticillium lecanii*,  
*Hirsutella thompsonii* y *Beauveria bassiana* (Hypocreaceae,  
Ascomycota), COMO BIOCONTROL DE *Triatoma infestans*  
(Klug 1834) (HEMIPTERA: REDUVIIDAE)**

**Comité de Tesis**



---

**Presidente**  
**Dr. Lucio Galaviz Silva**



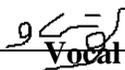
---

**Secretaria**  
**Dra. Zinnia Judith Molina Garza**



---

**Vocal**  
**Dra. Patricia Tamez Guerra**



---

**Vocal**  
**Dr. Gustavo Ponce García**



---

**Vocal**  
**Dra. Licet Villarreal Treviño**



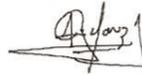
**SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO**

---

**Subdirector de Posgrado**  
**Dra. Katiushka Arévalo Niño**

**EFFECTO ENTOMOPATÓGENO DE *Verticillium lecanii*,  
*Hirsutella thompsonii* y *Beauveria bassiana* (Hypocreaceae,  
Ascomycota), COMO BIOCONTROL DE *Triatoma infestans*  
(Klug 1834) (HEMIPTERA: REDUVIIDAE).**

**Dirección de Tesis.**



---

**Presidente**

**Dr. Lucio Galaviz Silva**



---

**Asesor Externo**

**Dr. José Alejandro Martínez Ibarra**

**DERECHOS RESERVADOS©  
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

**Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.**

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Lucio Galaviz Silva** y a la **Dra. Zinnia Judith Molina Garza**, por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación en el Laboratorio de Patología Molecular y Experimental, el cual fue parte fundamental en mi desarrollo como estudiante. Por todos los consejos y el apoyo que siempre me brindaron; pero, sobre todo, gracias por todo el cariño que me mostraron durante estos cuatro años en los que hemos trabajado juntos.

A mi asesor externo el **Dr. José Alejandro Martínez Ibarra**, por haberme guiado en esos momentos de incertidumbre, brindándome esas palabras de sabiduría tan necesarias para seguir adelante. Por haber compartido conmigo sus conocimientos y consejos.

A mis padres, **Rogelio Pablo Leal** y **Ma. Antonieta Leal**, por siempre apoyarme, y nunca dejarme sola, por siempre tener esas palabras de aliento cuando las necesitaba; por siempre brindarme esos consejos tan preciados en cada paso de mi vida. Por todo, gracias.

A mis hermanas **Karla Leal** y **Pamela Leal**, las cuales han estado conmigo desde siempre, brindándome su apoyo incondicional. Gracias por motivarme en mis momentos más oscuros; por llenar mi vida de alegrías y amor cuando más lo he necesitado, pero por, sobre todo, gracias por aceptarme como soy. Gracias por siempre estar a mi lado.

A mis abuelos **Gilberto Olvera** y **Ma. Antonieta Hernández**, a mi tía **Alma Ivonne Olvera**, por siempre apoyarme y estar a mi lado. Aunque muchas veces no entiendan de lo que les estoy hablando.

## DEDICATORIA

A mi **familia**; por todo el amor recibido, la dedicación y la paciencia que me proporcionaron en todo el proceso de la realización de este proyecto; gracias por confiar en mis decisiones y siempre estar a mi lado apoyándome y guiándome en esta etapa de mi vida.

A mis **padres Rogelio Pablo Leal Rodríguez y Ma. Antonieta Olvera de Leal**; por guiarme en la vida. Por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación. Por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A mis **hermanas Karla Mariana Leal Olvera y Pamela Estefanía Leal Olvera**; por haberme respaldado en todo momento, ya que a pesar de todo siempre me brindaron su cariño y amistad, por ser mis grandes amigas, las quiero mucho y gracias por motivarme en mis momentos más oscuros.

A mis **abuelos; Gilberto Olvera Ortega y Ma. Antonieta Hernández Rojas**; a mi **tía Alma Ivonne Olvera Hernández**, por siempre apoyarme. Por todos los consejos y el apoyo que me brindan en los momentos difíciles de la vida. Por cuidarme y por siempre darme amor.

A mis guías a quienes respeto mucho, al **Dr. Lucio Galaviz Silvas** y a la **Dra. Zinnia Judith Molina Garza**, por siempre apoyarme y enseñarme a lo largo de la carrera. Por siempre brindarme su confianza y dedicación, además de que siempre estuvieron al pendiente de mí.

## INDICE

AGRADECIMIENTOS .....	5
DEDICATORIA .....	6
INDICE DE TABLAS .....	9
ÍNDICE DE FIGURAS .....	10
ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN .....	12
ABSTRACT .....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. ANTECEDENTES.....	16
2.1 Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas.....	16
2.2 Modo de transmisión.....	17
2.3 <i>Triatoma</i> en México .....	17
2.4 Los hongos como control biológico.....	18
2.5 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. ....	19
2.6 Uso de hongos entomopatógenos como bioplagueidad de triatómino.....	21
3. JUSTIFICACIÓN .....	24
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS.....	26
6 MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
6.1 Insectos.....	27
6.2 Cepas fúngicas.....	27
6.3 Formulaciones Acuosas .....	27
6.4 Formulaciones Aceitosas.....	28

6.5	Ensayos de patogenicidad .....	28
6.6	Verificación de mortalidad .....	28
6.7	Análisis estadístico .....	29
7.	Resultados.....	30
7.1.	Eficacia de formulados acuosos y aceitosos de los tres hongos.....	30
7.2.	Actividad <i>in vivo</i> de los distintos hongos.....	31
7.3.	Análisis de la adhesión interna y externa de los hongos.....	32
8.	Discusión .....	37
9.	Conclusión.....	42
10.	Perspectiva .....	43
11.	Bibliografía .....	44

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Mortalidad acumulada (%) de ninfas de estadio I de <i>Triatoma infestans</i> expuestas a inóculo con base acuosa de $1 \times 10^7$ conidios/mL de tres diversos hongos .....	30
<b>Tabla 2:</b> Mortalidad acumulada (%) de ninfas de estadio I de <i>T. infestans</i> expuestas a inóculo con base aceitosa de $1 \times 10^7$ conidios/mL de tres diversos hongos .....	31
<b>Tabla 3:</b> Resumen del análisis de supervivencia de Kaplan-Meier y eficacia para ninfas estadio I de <i>T. infestans</i> sometidas a inóculo con base aceitosa y acuosa de $1 \times 10^7$ conidios/mL de los tres hongos (n=30 insectos por grupo) .....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

<p><b>Figura 1.</b> Especies de mayor importancia epidemiológica en el oeste de México. a) <i>T. longipennis</i>; b) <i>T. barberi</i>. Imagen tomada de Unibio (2017)</p>	18
<p><b>Figura 2.</b> Ninfas inoculadas con solución A) aceitosa y B) acuosa de <i>H. thompsonii</i> en donde se observan zonas color grisáceo...</p>	32
<p><b>Figura 3.</b> Ninfa inoculada con solución acuosa de <i>H. thompsonii</i> donde no se puede observar zona grisácea en la parte abdominal.</p>	33
<p><b>Figura 4.</b> A) Ninfa inoculada con solución aceitosa de <i>Beauveria bassiana</i> donde se puede apreciar una zona grisácea, mientras que B) se puede apreciar la pata de la ninfa con varias pelusas.</p>	33
<p><b>Figura 5.</b> Ninfas inoculadas con solución a) aceitosa <i>H. thompsonii</i> en la caja de SDA, b) colonias color verde en el centro y alrededor un color blanco, con una consistencia algodonosa</p>	34
<p><b>Figura 6.</b> Ninfas inoculadas con solución acuosa de <i>H. thompsonii</i> A) donde se muestran pequeños puntos de color gris en toda la parte de la cabeza y del tórax, B) directamente conectados a él exoesqueleto de la ninfa.</p>	34
<p><b>Figura 7.</b> Detalles de cortes histopatológicos de secciones de cadáveres de ninfas I de <i>T. infestans</i> A) no infectadas e B) infectadas con solución acuosa de <i>B. bassiana</i> en 10x.</p>	35
<p><b>Figura 8.</b> Detalles de cortes histopatológicos de secciones de cadáveres de ninfas I de <i>T. infestans</i> A) No infectadas. B) Infectadas</p>	36
<p><b>Figura 9.</b> Detalles de cortes histopatológicos de secciones de cadáveres de ninfas I de <i>T. infestans</i> inoculadas con la solución aceitosa de <i>H. thompsonii</i></p>	36

## ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>%</b>	Porcentaje
<b>AFA</b>	Alcohol, formol, ácido acético
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentración letal 50
<b>CL<sub>90</sub></b>	Concentración letal 90
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetros al cuadrado
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal 50
<b>DL<sub>90</sub></b>	Dosis letal 90
<b>Et al.</b>	Y otros
<b>h</b>	Horas
<b>mL</b>	Mililitro
<b>PAHO</b>	Pan American Health Organization
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la Polimerasa
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>RH</b>	Humedad relativa
<b>SDA</b>	Agar sabouraud dextrosa
<b>SIDA</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>Spp.</b>	Especie
<b>TL<sub>25</sub></b>	Tiempo letal 25
<b>TL<sub>50</sub></b>	Tiempo letal 50
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>WHO</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>µl</b>	Microlitro

## RESUMEN.

La enfermedad de Chagas es una zoonosis compleja causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Se estima que hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas en el mundo y se originan 36,000 nuevos casos cada año. Debido a que el 80% de transmisión de los casos de Chagas en humanos se debe a los vectores invertebrados de la Familia Reduviidae, el control de esta enfermedad se basa en el control de triatómino. El uso de hongos entomopatógenos es una alternativa a los insecticidas químicos, gracias a su capacidad natural para regular poblaciones de insectos, afectando entre otros a especies vectores de esta enfermedad. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad entomopatógena de tres hongos (*Verticillium lecanii*, *Hirsutella thompsonii* y *Beauveria bassiana*) como control de *Triatoma infestans*, esto mediante el uso de formulados acuosos y aceitosos. Se prepararon suspensiones acuosas con  $1 \times 10^7$  conidios/mL y una formulación aceitosa con  $1 \times 10^7$  conidios/mL en solución con 49% de suspensión acuosa y 50% aceite comestible de soya. Se aplicaron 0.2  $\mu$ L de las soluciones sobre ninfas I. Se observó que los hongos evaluados tuvieron efectividad contra las ninfas I, *V. lecanii* tuvo una mayor efectividad de las soluciones acuosas con un 36.67% en comparación de *B. bassiana* y *H. thompsonii* las cuales tuvieron 33.33% y 30% respectivamente, mientras que, en las soluciones aceitosas, *B. bassiana* tuvo una efectividad de 76.67% que al compararse con *V. lecanii* y *H. thompsonii* fue mayor, obteniendo 53.34% y 43.34% propiamente. Al comparar los resultados de los bioensayos con las soluciones acuosas y aceitosas, pudimos observar un incremento en la efectividad, dado que la efectividad máxima obtenida en las soluciones acuosas fue de 36.67% comparado con un 76.67% obtenido en las soluciones aceitosas. En los cortes histológicos se observaron conidios en la parte del hemocele de las ninfas, confirmando así la adherencia y penetración de los hongos.

## ABSTRACT

Chagas disease is a complex zoonosis caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. It is estimated that there are between 6 and 7 million infected people in the world and 36,000 new cases originate each year. Since 80% of transmission of Chagas cases in humans is due to invertebrate vectors of the Family Reduviidae, the control of this disease is based on the control of triatomine. The use of entomopathogenic fungi is an alternative to chemical insecticides, thanks to its natural ability to regulate insect populations, affecting, among others, vector species of this disease. The objective of this work was to evaluate the entomopathogenic activity of three fungi (*Verticillium lecanii*, *Hirsutella thompsonii* and *Beauveria bassiana*) for *Triatoma infestans* control, using aqueous and oily formulations. Aqueous suspensions were prepared with  $1 \times 10^7$  conidia/mL and an oily formulation with  $1 \times 10^7$  conidia/mL in solution with 49% aqueous suspension and 50% edible soybean oil. 0.2  $\mu$ L of the solutions were applied to nymphs I. It was observed that the evaluated fungi were effective against nymphs I, *Verticillium lecanii* had a greater effectiveness of aqueous solutions with 36.67% compared to *B. bassiana* and *H. thompsonii* which had 33.33% and 30% respectively, while in the oily solutions, *B. bassiana* had a higher effectiveness of 76.67%, compared with *V. lecanii* and *H. thompsonii* which they obtained 53.34% and 43.34% properly. When comparing the results of the bioassays with the aqueous and oily solutions, we could observe an increase in effectiveness, since the maximum effectiveness of the aqueous solutions was 36.67% compared to 76.67% in the oily solutions. In the histological sections, conidia were observed in the hemocele part of the nymphs, thus confirming the adherence and penetration of the fungi.

## 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es causada por el protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), se transmite al hombre en forma natural por insectos hematófagos de la subfamilia *Triatominae* (Salazar-Schettino et al. 2016). Esta es una de las principales patologías tropicales desatendidas, la cual principalmente son transmitidas por insectos vectores (Vázquez-Martínez et al. 2014), existen otras formas de transmisión como lo son: la congénita (o vertical, transmitida de madres a hijos), las transfusiones de sangrey trasplante de órganos, la transmisión oral y la causada por accidentes de laboratorio (Concha-Valdez 2015).

Si bien esta enfermedad es endémica de América Latina, también es propicia en muchos países de Europa, en donde España se destaca como el país europeo con más casos (Concha-Valdez 2015), la mayor prevalencia es en las regiones rurales más pobres (Carrada-Bravo 2004). La tripanosomiasis americana es endémica en 21 países latinoamericanos, además que se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *T. cruzi* (WHO 2019), estimándose aproximadamente por transmisión vectorial 28,000 nuevos casos cada año y otros 8,000 por transmisión congénita (Linn et al. 2019). Esta enfermedad causa alta morbilidad y mortalidad, los cuales se pueden comparar a niveles observados para el virus de inmunodeficiencia humana/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (VIH/SIDA) en la región de América Latina (Vázquez-Martínez et al. 2014). México es un país endémico para la enfermedad de Chagas, dos terceras partes del territorio pueden ser consideradas en riesgo de presentar una transmisión vectorial, es decir que 1,100,000 individuos podrían estar infectados con *T. cruzi* y 29,500,000 en riesgo de contraer la infección (Salazar-Schettino et al. 2016).

Debido a que el 80% de transmisión de los casos de Chagas en humanos se debe a los insectos vectores o triatómino (PAHO 2019), el principal medio de control de la enfermedad se basa en la lucha contra los triatómino domiciliarios mediante el uso de insecticidas no selectivos, diseñados para controlar una gran variedad de insectos de la familia *Reduviidae* (Schofield 1994; Coura y Dias 2009). La utilización de plaguicidas de

origen químico de manera excesiva y sin previa asistencia técnica ha causado como consecuencia, la resistencia en los organismos de esta familia (Badii y Landeros 2007). Los entomopatógenos fúngicos son importantes agentes de control biológico de muchos insectos y otros artrópodos, por lo cual se ha observado un aumento en el uso comercial de estos agentes, ya que estos poseen la capacidad de invadir a sus hospederos y atravesar su exoesqueleto, esto mediante la adherencia de sus esporas en las partes bucales, tegumento y/o los espiráculos (Holder et al. 2017).

Actualmente en el control de las especies domiciliarias se utilizan insecticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides sintéticos, si bien los insecticidas piretroides son los más efectivos (Oliveira-Filho 1984), estos generan un mecanismo de resistencia en los triatómino, *Triatoma infestans* (Klug) y *Rhodnius prolixus* (Stål), los cuales son dos especies responsables en gran medida de la transmisión de *T. cruzi* (Vassena et al. 2000).

En este trabajo se tuvo como objetivo estudiar la actividad entomopatógena de 3 hongos *V. lecanii* (Ascomycota), *H. thompsonii* (Ascomycota) y *B. bassiana* (Ascomycota) como biocontrol contra *T. infestans* (Usinger), esto mediante el uso de formulados acuosos y aceitosos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas es causada principalmente por la transmisión vectorial del protozoo hemo flagelado *T. cruzi*, distribuida principalmente desde el sureste de Estados Unidos hasta Argentina (Ramsey et al. 2012). Es endémica en 21 países latinoamericanos en donde es señalada como la mayor causa de morbilidad y mortalidad, con alrededor de 6-7 millones de personas infectadas, 12,000 muertes anuales, y una incidencia de 56,000 casos al año (WHO 2019). En México se han descrito 34 especies de triatómino, colocándolo en el segundo lugar como el país con el mayor número de especies de triatómino en América, solamente precedido por Brasil. En México los triatómino pertenecen a siete géneros diferentes; *Triatoma* es el más abundante, cuenta con 27 especies (Magallon-Gastelun et al. 1998; Velasco-Castrejón y Rivas-Sánchez 2008).

El cuadro clínico de la tripanosomiasis americana se divide en dos etapas; la primera es la fase aguda, en esta los parásitos se encuentran en el torrente sanguíneo y presenta fiebre (la cual es curable en el 80% de los casos) como sintomatología, sin embargo, esta fase es raramente diagnosticada en zonas como son el norte de México y sur de los Estados Unidos de América, donde esta no es una enfermedad endémica, ya que puede pasar desapercibida por el médico al considerarla un padecimiento exótico (Prata 2001). La segunda etapa es la fase crónica, la cual se manifiesta a lo largo de la vida mediante el desarrollo de padecimientos como: cardiopatías, megacolon, megaesófago entre otros (Prata 2001). En Latinoamérica se estima que el 30% de los infectados desarrolla cardiomiopatía dilatada, contra la cual no hay tratamiento efectivo (Cárdenas-Sánchez et al. 2003).

Los síntomas de la enfermedad de Chagas pueden variar en su gravedad de acuerdo con la zona geográfica donde se localice, por lo cual algunos autores consideran que existen diferencias en la virulencia de las cepas circulantes e incluso en la resistencia natural a la enfermedad en algunas poblaciones (Becerril-Flores y Valle-De La Cruz 2003).

## **2.2 Modo de transmisión.**

La transmisión de esta enfermedad se puede realizar de dos maneras: (a) la primera por la transmisión no vectorial (transfusión sanguínea, trasplante de órganos, transmisión congénita, etc.), el cual es el principal problema en países no endémicos como Canadá, España, Japón, Australia y Estados Unidos, esto debido a la migración (Carabarin-Lima et al. 2011). (b) La segunda y la principal razón es: la transmisión vectorial, en donde el insecto a través de deyecciones de heces fecales transmite el parásito de *T. cruzi* el cual pasa al organismo a través de la piel o mucosas (Prata 2001). La mayoría de las personas que cuentan con esta enfermedad si bien son asintomáticos, estas personas se encuentran infectadas, los cuales se convierten en transmisores potenciales por transfusión, ya que, en la etapa crónica y asintomática, no son detectados mediante las pruebas serológicas recomendadas por la OMS (WHO 2019). Se estima que las personas en fase crónica o latente, al ser donadores potenciales, diseminan la enfermedad a 100 millones de personas, convirtiéndose en un importante factor de riesgo (Vega y Náquira 2005).

## **2.3 *Triatoma* en México.**

En México se han reportado 34 especies de triatómino (Galvañ et al. 2003). Los géneros más comunes son *Triatoma*, *Meccus* y *Rhodnius* (Gómez-Hernández et al. 2008). En el oeste de México las especies de mayor importancia epidemiológica son *T. longipennis* y *T. barberi* (Usinger) (Figura 1) debido a la migración de los vectores de hábitat silvestres a peri domésticos (Martínez-Ibarra et al. 2007). En las diferentes especies de vectores, se conocen sus formas de vida y hábitat, además algunos autores mencionan herramientas y estrategias específicas para interrumpir la transmisión vectorial (Lazzari y Lorenzo 2009); a pesar de esto, se recomienda la vigilancia y control de las poblaciones domésticas de triatómino para interrumpir la transmisión de este parásito (Cohen et al. 2006).



**Figura 1.** Especies de mayor importancia epidemiológica en el oeste de México. a) *T. longipennis*; b) *T. barberi*. Imagen tomada de Unibio (2017).

En Nuevo León, el único vector domiciliario y peridomiciliario reportado es *T. gerstaeckeri* (Stål), mientras que *T. neotomae* (Neiva), *T. lecticularia* (Stål) y *T. protracta* (Uhler) son vectores silvestres (Martínez-Ibarra et al. 2007; Molina-Garza et al. 2007). Recientemente se reportaron especies de *T. gerstaeckeri* positivos para la presencia de *T. cruzi* mediante microscopía óptica y PCR, lo cual corrobora su importancia como vectores en la transmisión de la enfermedad de Chagas en el noreste de México y Texas (Molina-Garza et al. 2007; Hotez et al. 2012).

#### **2.4 Los hongos como control biológico**

Los entomopatógenos fúngicos son importantes agentes de control biológico de muchos insectos y otros artrópodos, sin embargo, hay factores que pueden llegar a afectar su actividad, como lo son los factores ambientales, estos suelen ser críticos para el desarrollo óptimo del hongo, como además de la habilidad propia del hongo para sobrevivir a las condiciones adversas o periodos de ausencia de hospederos (Carruthers y Soper 1987).

En los últimos 10 años se ha visto un aumento del uso de hongos entomopatógenos de manera comercial. Los responsables de la dispersión y la infección de los diversos hongos entomopatógenos en condiciones naturales son conidios aéreos, la mayoría de los hongos hifomicetos entomopatógenos producen grandes cantidades de conidios fuertemente hidrófobas, esto gracias a sus paredes hidrofóbicas que confieren estabilidad ambiental (Wraight et al. 2001).

Estas características contribuyen significativamente a la eficiencia de la producción y la estabilidad de almacenamiento y han convertido a los conidios en los propágulos de elección para la mayoría de las formulaciones comerciales (Wraight et al. 2001); Sin embargo, incluso con estas características que favorecen su actividad, los conidios de los entomopatógenos suelen requerir altas concentraciones para controlar las plagas (Bartlett y Jaronski 1988).

Para la elaboración de un formulado de hongos entomopatógenos que sea viable para su comercialización, es importante tener en cuenta que los métodos de producción sean de bajo costo, que no cuente con una alta dificultad de producción para las distintas formulaciones, dado que estas deben de mantener su alta viabilidad, virulencia y su larga vida de anaquel (Wraight et al. 2001). Los materiales usados en formulaciones deben proporcionar algunas protecciones contra altas temperaturas, baja humedad y luz ultravioleta, los cuales son los mayores obstáculos para el establecimiento del hongo después de su aplicación (Castillo-Reyna 2002).

## **2.5 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos.**

La pared celular de los hongos se encuentra constituida por polisacáridos, principalmente quitina, que también se encuentra en los artrópodos y es de tipo estructural; además posee proteínas, que son glicoproteínas, con galactosa y manosa; lípidos (ácidos grasos); pigmentos, básicamente compuestos de melanina, y sales inorgánicas (Cazorla-Perfetti 2011), esto los ayuda a invadir a sus hospederos, para atravesar de su exoesqueleto, ya sea por adherencia de sus esporas en las partes bucales, tegumento y/o los espiráculos (Holder et al. 2017).

El proceso de invasión de los hongos en los hospederos artrópodos se puede dividir en las siguientes etapas:

- 1. Adhesión:** La espora o conidio viable, encuentra un lugar propicio sobre la cutícula o tegumento de sus hospedadores artrópodos, para establecer la relación patógeno- hospedador; en esta etapa, la superficie de la pared celular del hongo debe adherirse a la cutícula; existen diversas asociaciones inespecíficas y específicas para llevar esto a cabo, destacándose que los iones  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$

logran disminuir las fuerzas de repulsión electrostáticas entre ambas superficies al modificar la hidrofobicidad, que es determinada en parte a proteínas denominadas hidrofobinas y carbohidratos, facilitándose la unión pared celular fúngica-cutícula del invertebrado (Pucheta 2006).

- 2. Germinación:** Proceso que es disparado por los carbohidratos, los cuales actúan como mensajeros. Al estar presentes en el exoesqueleto de los artrópodos (Pucheta 2006) y al entrar en contacto con el tegumento, las esporas deben encontrar el sustrato nutricional (carbono, nitrógeno y otros elementos), así como las condiciones ambientales de alta humedad, temperatura y luz necesarias para su germinación; la cubierta mucigilana de las esporas posee propiedades antidesecantes, lo cual ayuda así a conservar su hidratación (Hegedus y Khachatourians 1995).
- 3. Formación de apresorios:** Después de ocurre el hinchamiento de las esporas, se forma un tubo germinativo o haustorio, además de un apresorio, esto mediante el crecimiento apical de la pared celular, estimulado por un flujo iónico ( $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{H}^{+}$ ) (Cazorla-Perfetti 2011). El tubo germinativo permite reconocer los receptores anivel del tegumento donde se fijará la hifa, y con el apresorio el hongo logra anclarse a la cutícula del hospedador, y posteriormente penetrar hacia el celoma del artrópodo (Hajek y Eastburn 2003).
- 4. Formación de estructuras de penetración:** La penetración se logra mediante mecanismos físicos (producto de la presión mecánica del apresorio) y químicos, (mediante la excreción de enzimas hidrolíticas, incluyendo, entre otras, proteasas, lipasas, quitinasas, quitobiasas y lipooxigenasas), las cuales logran degradar la cutícula del hospedador, apreciándose síntomas de histólisis, y adicionalmente ayuda a la penetración mecánica y proporciona nutrientes al hongo (St et al. 1996).
- 5. Colonización:** Una vez que el hongo logra penetrar, la hifa se ensancha y se ramifica para formar cuerpos hifales secundarios (blastosporos), esto invade todas las capas cuticulares, y luego se expande hacia los órganos internos del insecto y todo el hemocele, lo cual produce cambios patológicos como convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos alterados, para lograr su colonización

totaldespués de la muerte del artrópodo (Tanada y Kaya 1993).

- 6. Reproducción:** Posteriormente de la invasión interna, si la disponibilidad de agua es alta y la temperatura adecuada, la fase reproductiva del hongo se desarrolla en dos etapas: micelización y esporulación, entonces emerge fuera del insecto después de atravesar la cutícula, especialmente por las áreas más débiles (espiráculos, regiones intersegmentales, etc.) hasta cubrir de esporas la superficie del insecto, para lograr así la producción suficiente de inóculo para infectar a otros insectos; por el contrario, si las condiciones son secas, el proceso reproductivo fúngico se detiene, solo se observan los insectos momificados y no cubierto por una capa algodonosa (micelización) o por una especie de polvillo blanco, verde o lila (esporulación) (Goettel y Inglis 1997).

## **2.6 Uso de hongos entomopatógenos como bioplagueicidad de triatómino.**

Si bien los hongos *Metarhizium anisopliae* y *B. bassiana* se han estudiado ampliamente para su actividad entomopatógena en Triatómino, los hongos *B. brongniartii*, *Nomuraea rileyi*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Eylachovaea* sp., *Penicillium corylophilum*, *Aspergillus giganteus*, *Lecanicillium psalliotae* y *Pochonia chlamydosporia* se han estudiado en menor cantidad (Cazorla-Perfetti 2011).

Romaña et al. (1987) analizaron la actividad patogénica de 14 cepas de *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *M. anisopliae*, *N. rileyi* y *P. fumosoroseus* en ninfas de primer estadio de *R. prolixus*, en el cual obtuvieron que a concentraciones de  $3 \times 10^5$  conidios/cm<sup>2</sup>, solo 2 cepas, *B. bassiana* n. 297 y *B. bassiana* n. 326 mataron al 100% de las larvas a los 10 días después de la exposición.

Luz et al. (1999) analizaron 23 aislamientos de *B. bassiana* y 13 aislamientos de *M. anisopliae* en ninfas del tercer estadio de *T. infestans*, reportan que a una humedad saturada este insecto es muy susceptible a la infección por hongos. A menor humedad relativa (50%), la cual son las condiciones esperadas en microhábitat del vector, la virulencia fue significativamente diferente entre los 36 aislamientos. La mortalidad acumulada 15 días después del tratamiento varió de 17.5 a 97.5%, y las estimaciones del tiempo de supervivencia del 50% variaron de 6 a 11 días. Las concentraciones

letales suficientes para matar el 50% de los insectos (CL<sub>50</sub>) variaron de  $7.1 \times 10^5$  a  $4.3 \times 10^6$  conidios/mL, para un aislado de *B. bassiana* (CG 14) y un aislado de *M. anisopliae* (CG 491) respectivamente.

Vásquez et al. (2005) evaluaron el efecto del hongo *B. bassiana* (cepa UdeA13) en ninfas de quinto estado de desarrollo de *R. prolixus* bajo condiciones de laboratorio. Los tratamientos consistieron en suspensiones de conidios del hongo entomopatógeno *B. bassiana* en concentraciones de  $3 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^8$  y  $3 \times 10^9$  conidios/mL, las cuales se asperjaron sobre los insectos con un sistema emulador de la Torre de Pulverización de Burgerjon. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre todos los tratamientos y el control. Las concentraciones  $3 \times 10^8$  y  $3 \times 10^9$  conidios/mL produjeron entre un 90 y 100% de mortalidad entre los días 7 y 9 después del tratamiento.

Cazorla-Perfetti et al. (2007) analizó los efectos de gradientes térmicos, salinos y pH sobre la germinación *in vitro* de un aislado nativo de *B. bassiana* (bálsamo) Vuillemin, patógeno para *R. prolixus* y *T. maculata*. Se observó que los conidios no germinaron en las temperaturas extremas (6 y 40°C), obteniéndose porcentajes de germinación >99% en el rango de 21-34°C. La germinación del hifomicete decreció significativamente con el incremento de la concentración de NaCl, inhibiéndose completamente a partir de la [NaCl] del 7%, y a los pH 1.32 y 11-12. Los porcentajes de germinación fueron significativamente más elevados (>99%) en el rango de pH de 4 a 10.

Rocha et al. (2011) analizaron *L. psalliotae*, *P. lilacinus* y *P. chlamydosporia* aislados de suelos en el centro de Brasil contra *R. neglectus*, *R. nasutus*, *R. prolixus* y *R. robustus*. Los primeros insectos muertos se detectaron entre 7 y 12 días después de los tratamientos conidiales, independientemente de las especies de hongos, triatómino o la concentración de conidios probada. Al tratar a las ninfas de *R. neglectus* y *R. nasutus* con una concentración de  $2.33 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> murieron más rápidamente con valores de TL<sub>50</sub> de entre 12.8 días (*R. neglectus* tratado con *P. lilacinus*) y 18.6 días (*R. nasutus* tratado con *L. psalliotae*). No hubo un efecto claro de las especies de hongos sobre la mortalidad de *Rhodnius* spp. Todos los hongos probados se desarrollaron en ninfas muertas, y se detectaron conidios de las tres especies de hongos en las superficies de  $\geq 90\%$  de los cadáveres después de un período de incubación post mortem de 10 días.

Vázquez-Martínez et al. (2014) evaluaron la patogenicidad *G. virens*, *T. flavus*, *B. bassiana* y *M. anisopliae* en ninfas de *T. dimidiata* y adultos a concentraciones de  $1 \times 10^8$  conidios, en adultos se observó una patogenicidad similar entre *B. bassiana*, *G. virens* y *T. flavus* ( $p > 0.05$ ), los cuales difirieron de las ninfas ( $p = 0.009$ ). Las cepas más entomopatógenas en triatómino adultos fueron *B. bassiana* y *G. virens*, los cuales causaron el 100% de mortalidad. En las ninfas, la cepa más entomopatógena fue *B. bassiana*, seguida de *G. virens*.

Castellanos-Sánchez et al. (2014) determinaron la capacidad biocida de hongos nativos entomopatógenos: *B. bassiana* para el control de *T. infestans* de ninfas del cuarto estadio. En las concentraciones de esporas de  $2.2 \times 10^8$  para *Beauveria* sp y de  $2.6 \times 10^8$  para *B. bassiana*, se obtuvo una mortalidad del 100% a los 10 días y 85% a los 32 días, respectivamente.

Cazorla-Perfetti y Morales Moreno (2016) analizaron el efecto de formulaciones acuosas y aceitosas de 13 aislamientos nativos de *B. bassiana* sobre *R. prolixus* bajo condiciones experimentales. Los resultados mostraron que las formulaciones aceitosas fueron significativamente más eficientes que las acuosas, esto al incrementar la mortalidad y eficacia, además de disminuir la  $DL_{50}$  ( $p < 0.05$ ).

Flores-Villegas et al. (2018) estudiaron los efectos en los huevos de *T. pallidipennis* de dos hongos entomopatógenos, *Isaria fumosorosea* EH-511/3 y *M. anisopliae* EH-473/4. Las tasas de mortalidad causadas por *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* fueron  $92\% \pm 3.1$  y  $88\% \pm 3.7$ , respectivamente. La tasa de esporulación y la producción conidial fueron mayores en *I. fumosorosea* que en *M. anisopliae*.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una infección parasitaria producida por *T. cruzi* y transmitida por insectos hematófagos de la familia Reduviidae. Esta enfermedad se encuentra distribuida en gran parte del continente americano, con un elevado índice de prevalencia y gravedad de los cuadros clínicos, en la cual la miocardiopatía crónica chagásica, es uno de los problemas de Salud Pública en América Latina. La vía principal de transmisión es mediante la picadura del vector, al cual se le adjudica un 80% de los casos de Chagas en humanos, por lo cual el uso excesivo de insecticidas ha sido el método más utilizado para el control de esta enfermedad; sin embargo, el uso indiscriminado de estos compuestos puede generar una resistencia cruzada en algunos individuos, la cual puede mantenerse durante generaciones.

En algunas especies de triatóminos, se ha reportado la resistencia hacia algunos insecticidas de uso generalizado para el control de diversas plagas como lo son: la deltametrina, betacipermetrina, betaciflutrina y lambdacihalotrina. Para minimizar el riesgo de resistencia, de acuerdo con el manejo integrado de plagas señalado por la OMS, es necesario incluir controladores biológicos, manejo ambiental y la utilización de insecticidas de origen botánico.

El uso de formulados fúngicos como una alternativa a la aplicación de insecticidas químicos comerciales, cuenta con un amplio campo de estudio, esto gracias a su capacidad natural para regular las poblaciones de insectos. El empleo de hongos entomopatógenos contra insectos es una alternativa viable, pues la compatibilidad de los hongos entomopatógenos con predadores y parásitos ya ha sido demostrada.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los hongos entomopatógenos *V. lecanii*, *H. thompsonii* y *B. bassiana* presentan una alternativa viable como control de vectores gracias a su efecto tóxico sobre *T. infestans* en ninfas de primer estadio.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad tóxica que presentan formulados fúngicos contra *T. infestans*, principal vector de la enfermedad de Chagas.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Analizar la actividad *in vivo* de tres distintos hongos en ninfas de primer estadio de *T. infestans*.
2. Comparar la eficacia de formulados acuosos y aceitosos de los tres hongos
3. Comprobar mediante estudios histopatológicos la adhesión interna del hongo.

## 6 MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Insectos

Los insectos se criaron en el Laboratorio de Patología Molecular y Experimental (LPME) perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, alimentándose una vez a la semana con sangre de rata albina (*Rattus norvegicus albinus*). Se mantuvieron a una temperatura promedio de 26.1 °C (24-30°C) y a una humedad relativa promedio de 62.4% (58-67%) (Cazorla y Morales 2016). Los ensayos se hicieron con colonias de la especie *T. infestans* (cepas susceptibles), empleándose ninfas de primer estadio proporcionadas por el Laboratorio de Entomología Médica de la Universidad de Guadalajara. Una semana antes de cada bioensayo, los triatóminos fueron alimentados. Dos días antes del bioensayo, todos los triatóminos se desinfectaron mediante un tratamiento de dos minutos con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%. Los insectos fueron lavados tres veces con agua estéril triple destilada y secada (Vázquez-Martínez et al. 2014).

### 6.2 Cepas fúngicas.

Las cepas *V. lecanii* y *H. thompsonii* fueron obtenidas de la ATCC (ATTC® 36967<sup>TM</sup> y 60808<sup>TM</sup>), mientras que la cepa de *B. bassiana*, fue proporcionada por la Unidad de Formulación de Biológicos y Coordinador de Vinculacione Innovación Tecnológica Reactivación de cepas, perteneciente a la Facultad De Ciencias Biológicas; UANL.

Los hongos se cultivaron en medio de Agar Dextrosa Saboroud (BD BIOXON) a 24 ± 1 °C, esto alrededor de 7 días o hasta que los conidios fueran visibles. De allí fueron reactivados en ninfas de primer estadio de *T. infestans* antes de iniciar los bioensayos.

### 6.3 Formulaciones Acuosas

Se preparó suspensiones conidiales mediante el raspado de los cultivos en cajas con el uso de un asa de platino, el cual se suspendió en 01% Tween20 con agua destilada estéril. Se midió la viabilidad de los hongos mediante la germinación conidial en medio SDA, esto bajo condiciones óptimas. Las suspensiones con una germinación mayor a 90% fueron

utilizadas para los bioensayos (Vázquez-Martínez et al. 2014). La suspensión acuosa de conidios fue ajustada mediante hemocitómetro (Nebauer improved, Marienfeld, Alemania) a  $1 \times 10^7$  conidios/mL (Goettel y Inglis 1997) y utilizada de inmediato (Cazorla y Morales 2016).

#### **6.4 Formulaciones Aceitosas**

La conformación de las soluciones aceitosas fue del 49% de las suspensiones acuosas, 50% de aceite comestible estéril, y se agregó 1% Tween20, esto ajustado a  $1 \times 10^7$  conidios/mL (Cazorla y Morales 2016).

#### **6.5 Ensayos de patogenicidad.**

Los bioensayos se realizaron en ninfas de primer estadio, estos fueron en grupos de 10 individuos por triplicado para cada formulado. Se realizó la aplicación tópica de 0.2  $\mu$ L en las ninfas de primer estadio con ayuda de una micropipeta. Las suspensiones consistieron en formulaciones acuosas y aceitosas en las concentraciones  $1 \times 10^7$  conidios/mL. Se tomó como control negativo a los insectos tratados con agua destilada sin conidios, y como controles positivos a los insectos tratados 1% Tween20 con  $1 \times 10^7$  conidios/mL de *B. bassiana*. Los triatóminos tratados se colocaron en contenedores dentro de una cámara ambiental a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $75 \pm 5\%$  o 90% de humedad relativa (RH) (Vázquez-Martínez et al. 2014). Las mortalidades de los insectos se registraron diariamente durante 15 días después del tratamiento.

#### **6.6 Verificación de mortalidad.**

Los insectos muertos se removieron diariamente para después ser transferidos a cámaras húmedas para observar la esporulación del hongo en las mismas condiciones del experimento. Se asumió que la causa de muerte es debida a la acción patógena de los hongos cuya morfo-taxonomía se verifico mediante la inoculación en placas con SDA (Romaña y Fargues 1992; Vázquez et al. 2005). Los triatomas que murieron fueron

deshidratados en fijador AFA, estos fueron enviados al Instituto Tecnológico de Sonora en donde se realizaron los cortes histológicos (Tolosa et al. 2003).

Para comprobar el crecimiento macroscópico de los hongos, en cajas de Petri de SDA se colocaron ninfas que hayan muerto en el transcurso de los bioensayos, después se colocaron dentro de una cámara ambiental a  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $75 \pm 5\%$  o  $90\%$  de humedad relativa (RH)

### **6.7 Análisis estadístico.**

Se realizaron un análisis de supervivencia mediante los métodos no paramétricos de producto-límite de Kaplan-Meier y la prueba generalizada de Gehan-Wilcoxon (Kaplan y Meier 1958; Gramatges 2002). Asimismo, se calculó el tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) mediante el mismo el mismo método (Beltrán *et al.* 2008).

El porcentaje de eficacia de cada aislamiento se determinó mediante la fórmula de Schneider-Orelli (Carrillo 1973), la cual corrige los efectos de la mortalidad natural, y así se permite determinar la verdadera eficacia de los tratamientos.

$$Efficacy (\%) = \frac{(A-B)}{(100-B)} \times 100$$

“A” equivale al porcentaje de individuos muertos en el tratamiento.

“B” equivale al porcentaje de individuos muertos en el control.

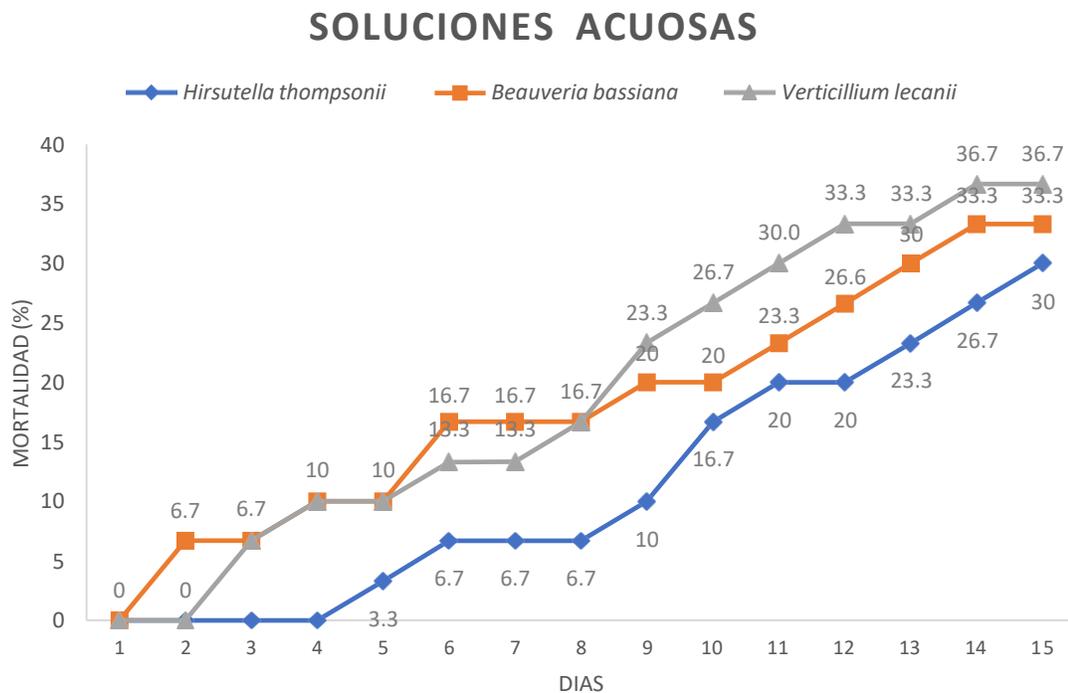
Además, se realizó un análisis de varianza y una comparación múltiple de Student-Newman-Keusl (SNK) para evidenciar diferencias entre tratamientos. considerándose como significativo una probabilidad de  $p < 0.05$ . Los datos se analizaron con los paquetes estadísticos SSPS 17.

## 7. Resultados

### 7.1. Eficacia de formulados acuosos y aceitosos de los tres hongos.

Para los bioensayos se utilizaron soluciones acuosas y aceitosas de tres distintos hongos para analizar su efectividad contra ninfas del primer estadio de *T. infestans*. Al comparar el porcentaje de mortalidad acumulada a los 15 días para las ninfas que fueron expuestas a las soluciones acuosas, *V. lecanii* tuvo una mortalidad del 36.7%. seguido por *B. bassiana* con 35.3% y *H. thompsonii* con un 30%, estos fueron inoculados con una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL, los resultados completos se puede observar en la tabla 1.

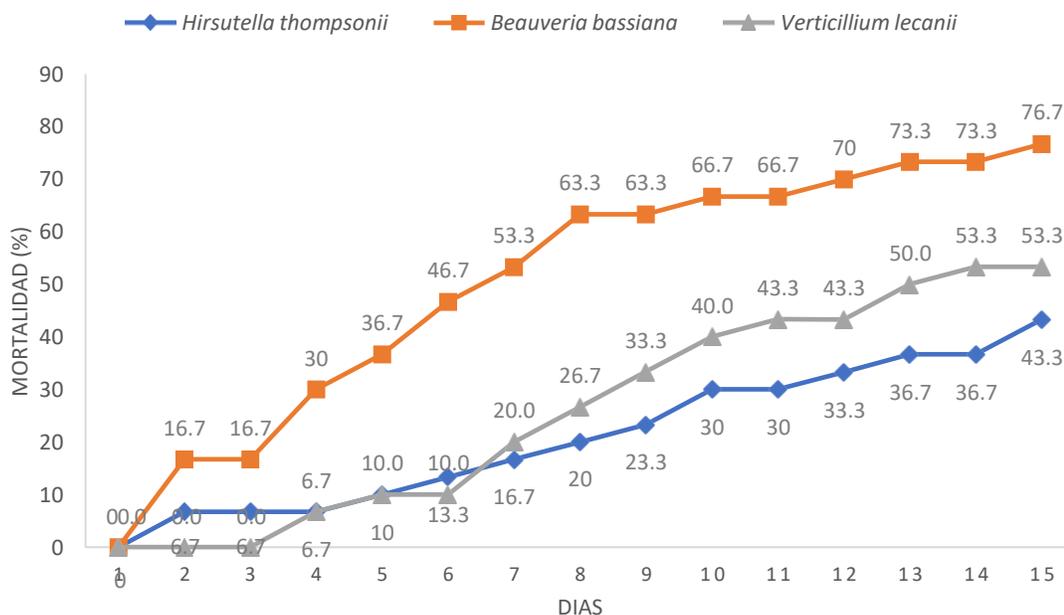
**Tabla 1:** Mortalidad acumulada (%) de ninfas de estadio I de *T. infestans* expuestas a inóculo con base acuosa de  $1 \times 10^7$  conidios/mL de tres diversos hongos.



Para los resultados correspondientes a las soluciones aceitosas, el por ciento de mortalidad acumulada en el transcurso de 15 días aumento para los tres hongos, para *B. bassiana* fue de 76.7%, 53.3% para *V. lecanii* y, por último, *H. thompsonii* causó un 43.3%, de mortalidad acumulativa, los detalles se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2:** Mortalidad acumulada (%) de ninfas de estadio I de *T. infestans* expuestas a inóculo con base aceitosa de  $1 \times 10^7$  conidios/mL de tres diversos hongos.

## SOLUCIONES ACEITOSAS



### 7.2. Actividad *in vivo* de los distintos hongos.

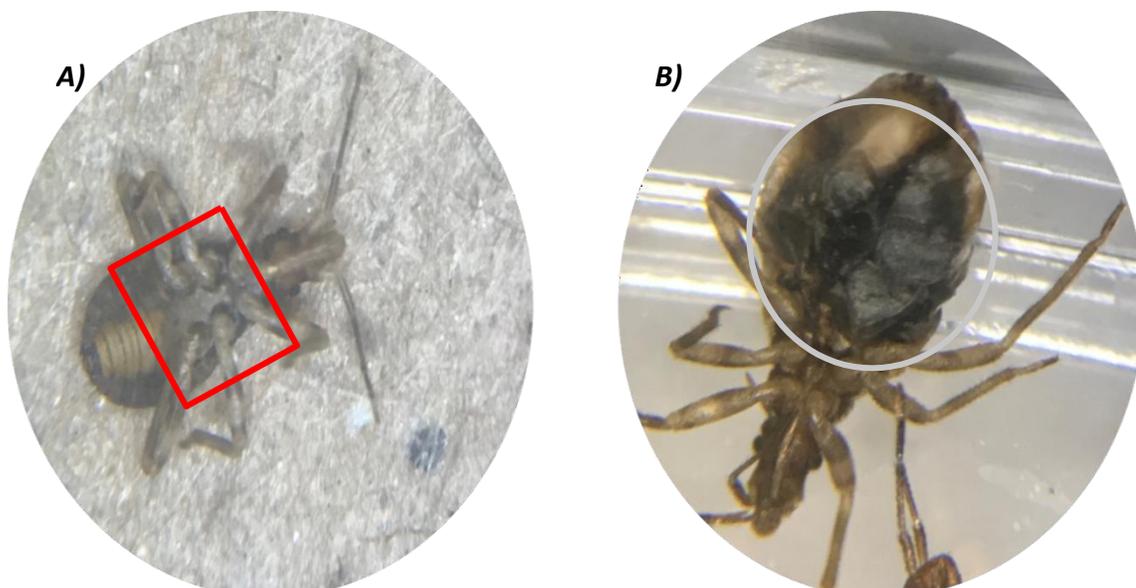
Al analizar los resultados completos de los tres hongos en las ninfas que fueron expuestas a las soluciones aceitosas, *B. bassiana* obtuvo la tasa de supervivencia más baja, como resultado, alcanza la mayor tasa de efectividad, mientras que las que fueron expuestas a las soluciones acuosas de *H. thompsonii* tuvieron la mayor tasa de supervivencia y la menor tasa de eficacia, tal y como se puede apreciar en la tabla 3.

**Tabla 3:** Resumen del análisis de supervivencia de Kaplan-Meier y eficacia para ninfas estadio I de *T. infestans* sometidas a inóculo con base aceitosa y acuosa de  $1 \times 10^7$  conidios/mL de los tres hongos (n=30 insectos por grupo).

Hongo	Solución	Supervivencia %	Eficacia %	Media (Días)	Des. Estándar	TL50 (Días)	TL25 (Días)
<i>Beauveria bassiana</i>	Aceitosa	33.33	76.67	8.23	0.91	7	4
	Acuosa	76.67	33.33 <sup>a</sup>	12.63	0.76	*	12
<i>Hirsutella thompsonii</i>	Aceitosa	66.67	43.33 <sup>ab</sup>	12.30	0.79	*	10
	Acuosa	70	30 <sup>a</sup>	13.60	0.54	*	14
<i>Verticillium lecanii</i>	Aceitosa	46.67	53.33 <sup>b</sup>	11.63	0.70	13	8
	Acuosa	63.33	36.67 <sup>a</sup>	12.40	0.73	*	10
Control		100	0	0	0	0	0

### 7.3. Análisis de la adhesión interna y externa de los hongos.

En la figura 2A se muestra el cadáver de una ninfa la cual fue inoculada con una solución aceitosa de *H. thompsonii*, se puede distinguir en la posición del ventral en donde se encuentran conectados las patas, una parte color grisáceo el cual se encuentra encerrado en un recuadro roja, esta misma coloración se logra ver en la ninfa que fue inoculada con la solución acuosa (Figura 2B), solo que se observó en la parte Urosternito del abdomen, la cual se puede observar encerrada en círculo verde.



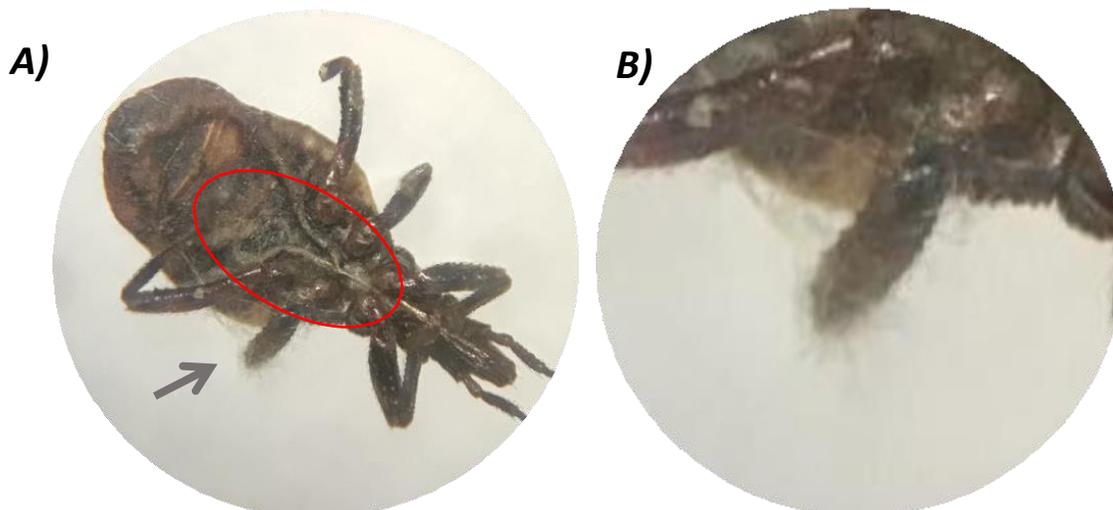
**Figura 2.** Ninfas inoculadas con solución A) aceitosa y B) acuosa de *H. thompsonii* en donde se observan zonas color grisáceo.

En la figura 3, se puede apreciar una ninfa que fue inoculada con una solución acuosa de *H. thompsonii*, no observándose ninguna zona grisácea, solo la coloración general de la ninfa, la cual es de un color café claro.



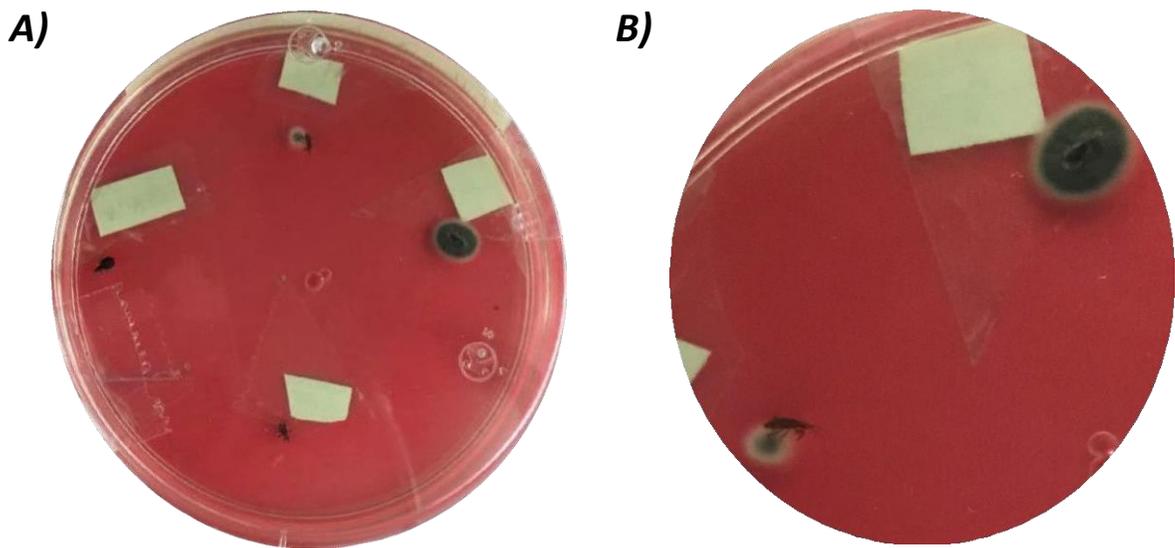
**Figura 3.** Ninfa inoculada con solución acuosa de *H. thompsonii* donde no se puede observar zona grisácea en la parte abdominal.

En la figura 4 se muestra una ninfa que fue inoculada con solución aceitosa de *B. bassiana*, en la figura 4A se observa la zona grisácea que se encuentra en la parte del abdomen, también en la parte de las patas se logra observar pequeñas zonas con tipo pelusas, estas marcadas con una flecha, mientras que en la 4B se puede apreciar a más detalles estas pelusas de color gris/blanco.



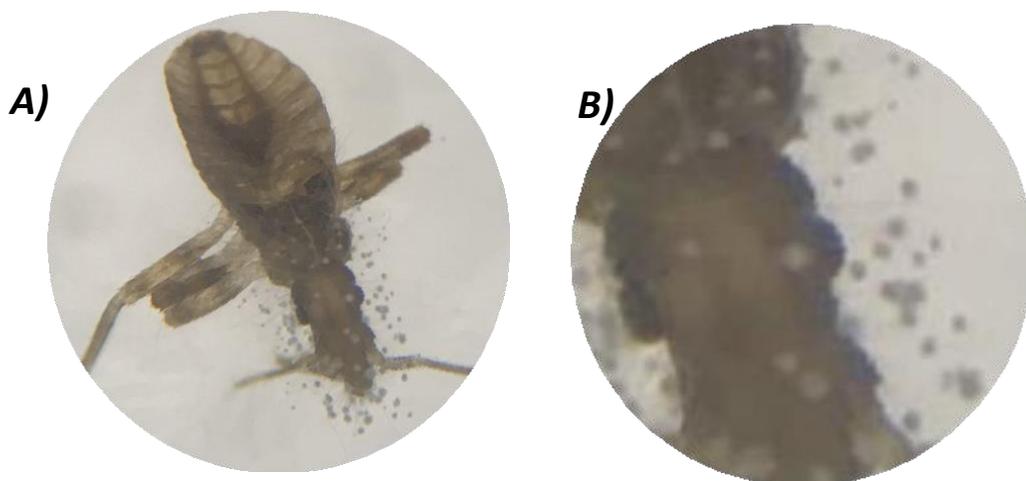
**Figura 4.** A) Ninfa inoculada con solución aceitosa de *B. bassiana* donde se puede apreciar una zona grisácea, mientras que B) se puede apreciar la pata de la ninfa con varias pelusas.

Se examinó la morfología macroscópica de las ninfas que fueron inoculadas soluciones aceitosas de *H. thompsonii*, donde se pudo apreciar crecimiento de colonias color verde cerca de la ninfa (Figura 5A), las colonias que crecieron alrededor de la ninfa fueron de un color verde en el centro y en su alrededor color blanco, el cual era una colonia tipo algodonosa (Figura 5B).



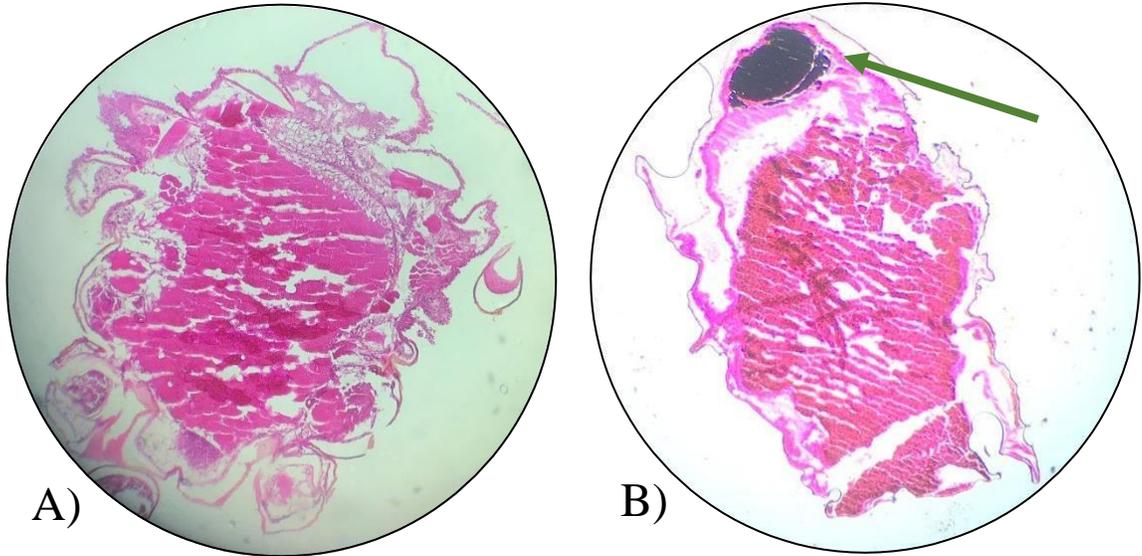
**Figura 5.** Ninfas inoculadas con solución a) aceitosa *H. thompsonii* en la caja de SDA, b) colonias color verde en el centro y alrededor un color blanco, con una consistencia algodonosa.

En las cajas inoculadas con las chinches examinadas bajo estereoscopio había crecimiento alrededor toda la parte de la cabeza y del tórax, tal y como se observó en las chinches que fueron inoculadas con *H. thompsonii* (Figura 6A), al examinarlo a más detalle se encontraron las pequeñas colonias de hongos conectados directamente con la ninfa (Figura 6B), estas colonias fueron de un color gris, similar al observado en la morfología inicial de este hongo.



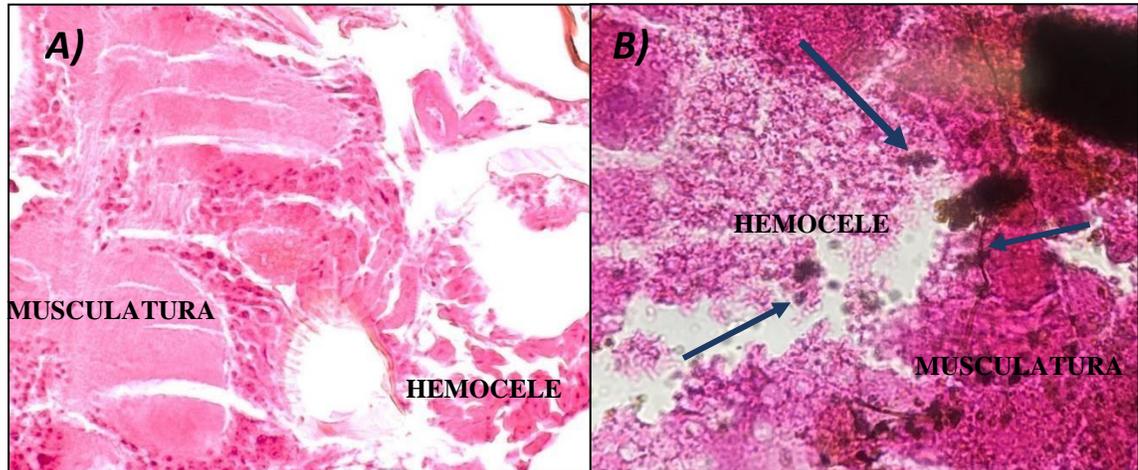
**Figura 6.** Ninfas inoculadas con solución acuosa de *H. thompsonii* A) donde se muestran pequeños puntos de color gris en toda la parte de la cabeza y del tórax, B) directamente conectados a él exoesqueleto de la ninfa.

En la figura 7A se examina el tejido perteneciente a una ninfa la cual no fue inoculada con soluciones de hongos, observándose la ausencia de cuerpos oscuros, además de una coloración rosa y morada, con un hemocele claro y espacioso; mientras que los cortes realizados a las ninfas inoculadas con hongos se presenta una menor cantidad de área del hemocele y un acumulo de color negro el cual fue marcado con una flecha (Figura 7B).



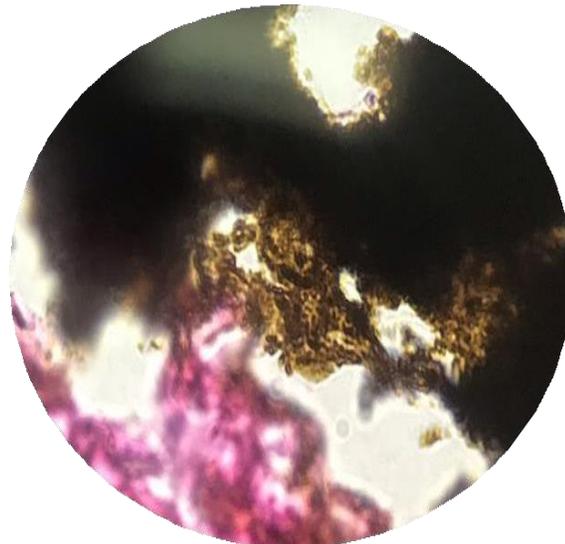
**Figura 7.** Detalles de cortes histopatológicos de secciones de cadáveres de ninfas I de *T. infestans* A) no infectadas e B) infectadas con solución acuosa de *B. bassiana* en 10x.

En la figura 8A se muestra con más detalle la parte del hemocele y musculatura del control negativa en donde no se aprecia ningún cuerpo extraño y una coloración en general color rosa claro, eosinófilo, mientras que en la figura 8B, se aprecia el desarrollo de varios cuerpos oscuros, además de varios cuerpos en forma de círculos y líneas, estos objetos desarrollaron en los dos tipos de soluciones de los tres hongos que fueron probados.



**Figura 8.** Detalles de cortes histopatológicos de secciones de cadáveres de ninfas I de *T. infestans* A) No infectadas. B) Infectadas

Al realizar un enfoque en la parte oscura presente en los cortes histológicos de las chinches que fueron inoculados con las soluciones de hongo se observó que están conformados por pequeñas células circulares de color café oscuro, en donde la morfología no se asemeja a ningún tejido que se encuentre en el control negativo (Figura 9).



**Figura 9.** Detalles de cortes histopatológicos de secciones de cadáveres de ninfas I de *T. infestans* inoculadas con la solución aceitosa de *Hirsutella thompsonii*.

## 8. Discusión

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una de las principales patologías transmitidas por insectos vectores (Salazar-Schettino et al. 2016), en donde el 80% de la transmisión de los casos en humanos es debido a los insectos vectores o triatóminos (PAHO 2019). El principal medio de control de la enfermedad se basa en el uso de insecticidas no selectivos (Schofield 1994; Coura y Dias 2009), teniendo como consecuencia, la resistencia en los organismos de esta familia (Badii y Landeros 2007), a causa de que los entomopatógenos fúngicos son importantes reguladores naturales de insectos y arácnidos; principalmente los pertenecientes a los grupos *Hypocreales* (Ascomycota) y *Entomophthoromycota* (Chandler 2017), además del aumento en el uso comercial de estos agentes, y al poco estudio de los mismo; en este trabajo se realizó el análisis de tres hongos (*V. lecanii*, *B. bassiana* y *H. thompsonii*) pertenecientes al grupo de los *Hypocreales*, mediante el uso de soluciones acuosas y aceitosas para comprobar su efectividad contra ninfas de primer estadio de *T. infestans*.

Como parte de la evaluación de la actividad tóxica, se analizó la mortalidad acumulada de los extractos acuosos en ninfas de *T. infestans* posterior a los 15 días de la inoculación con una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL de los hongos: *V. lecanii*, *B. bassiana* y *H. thompsonii*. *V. lecanii* presento una mortalidad del 36.67%, seguido por *B. bassiana* con un 33.33% y *H. thompsonii* con un 30%.

*Beauveria bassiana* es uno de los hongos más estudiados contra triatóminos, en el cual se ha observado que a concentración de  $10^8$  conidios/mL presenta una mortalidad del 50% (ninfas V, *Rhodnius prolixus*) en 6 días (Vásquez et al. 2005), mientras que a una concentración de  $1.00 \times 10^8$  por 33 días presento una mortalidad del 93%; a una concentración de  $2.57 \times 10^8$ , presento una mortalidad del 73% (Castellanos Sánchez et al. 2003). En el presente estudio se obtuvo una mortalidad del 33.33% en un lapso de 15 días, utilizando una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml, en ninfas de primer estadio de *T. infestans*, si bien el porcentaje obtenido en el bioensayo realizado es menor a lo observado en los estudios previamente mencionados, la mortalidad presentada nos permite inferir

que este presenta un efecto entomopatógeno en las ninfas estudiadas, cabe mencionar que este tipo de variaciones entre las mortalidades de este hongo, no es fuera de lo reportado en la literatura, ya que es posible observar estudios donde se obtiene TL50 <de 9 días (Cazorla Perfetti y Morales Moreno 2018) o de 26 días al inocularse concentraciones de  $1 \times 10^7$  (Luz y Fargues 1999). Esta fluctuación en los porcentajes de la mortalidad por *B. bassiana* se puede deber a diversos factores como lo son; el estadio y la especie de las ninfas en cual se realizaron los bioensayos, la concentración del extracto, además de la solución aplicada. Con estos resultados es posible apreciar la eficacia de este hongo contra las ninfas de primer estadio de *T. infestans*.

Si bien *B. bassiana* se encuentra ampliamente estudiado, en el caso de *V. lecanii* y *H. thompsonii* la literatura sobre su efecto entomopatógeno en triatomas no es muy extensa. Dentro de la literatura, Martínez et al. (2017), utilizaron concentraciones de  $1 \times 10^7$  de soluciones acuosas de *V. lecanii* en *Myzus persicae nicotianae*, presentando una mortalidad del 40% a las 72h, mientras que Del Prado et al. (2008), analizó la efectividad de *V. lecanii* en huevos y ninfas de hemiptera *Aleurodicus cocois* a una concentración de  $1 \times 10^8$  de una solución acuosa, el cual mostro una mortalidad de 75%, ocurriendo la máxima mortalidad en el día 7. Al analizar los resultados obtenidos de las soluciones acuosas, *V. lecanii* presento una mortalidad del 36.67% en las ninfas de primer estadio de *T. infestans*, utilizando una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml, en un lapso de 15 días. Si bien en la mortalidad obtenida en *T. infestans* fue menor que a la obtenida en los estudios de Martínez et al. (2017), esto se pudo haber debido a que la composición del exoesqueleto de los hemípteros (Presencia de discos dorsales con porosidades, diferente composición proteica, etc), diferente concentración, o a que la cepa no fue aislada directamente de triatomas, sin embargo, similar a la presentado por *B. bassiana*, *V. lecanii* cuenta con un efecto de mortalidad satisfactorio en ninfas de primer estadio pertenecientes a *T. infestans*

Al igual que lo presentado en *V. lecanii*, se puede observar que la mortalidad de *H. thompsonii* obtenida en *T. infestans* es menor que a la conseguida en otros hemípteros, obteniendo un 30% de mortalidad en las ninfas de primer estadio inoculadas con una

concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml de la solución acuosa; siendo un 56.5% menor a lo obtenido por Quesada-Sojo y Rivera-Méndez (2016), los cuales alcanzaron un 86.5% a los 6 días en *Planococcus citri*. En *Varroa mite*, se ha obtenido mortalidades de 50% entre los 2 a 6 días entre las distintas de las cepas analizadas (Peng et al. 2002).

Nuestros resultados demuestran que existe una actividad entomopatógena de los tres hongos en *T. infestans*, de igual manera se puede observar que la mortalidad puede variar de acuerdo a las condiciones del estudio, siendo uno de los factores principales la cepa de hongo que se utiliza, ya que nuestra cepa no fue aislada directamente de triatomas, esto puede ser una causa de la variación en la mortalidad de nuestros resultados comparado con los estudios mencionados, no obstante se observa que existe un efecto como biocontrol en ninfas pertenecientes a *T. infestans*, lo cual es importante dado que en la literatura no se cuenta con registro previos de *H. thompsonii* y *V. lecanii* como biocontrol para estos insectos.

En la mayoría de la literatura reportada se utilizan soluciones acuosas para la aplicación de los hongos entomopatógenos., sin embargo, también hay estudios donde comparan la efectividad de las soluciones acuosas con las soluciones aceitosas, debido a esto se decidió comparar la mortalidad obtenida entre las ninfas de primer estadio de *T. infestans* que fueron inoculadas con soluciones acuosas y las inoculadas con soluciones aceitosas, encontrando una mayor mortalidad acumulada al cabo de los 15 días en las ninfas inoculadas con las soluciones aceitosas. Para *V. lecanii* se observó un aumento del 16.7% en la eficacia de las soluciones aceitosas (53.3%) en comparación con las soluciones acuosas (36.67%), mientras que en el caso de *H. thompsonii* hubo un aumento de 13.33% de efectividad, pasando de una eficacia de 30% en las soluciones acuosas a 43.3% en las soluciones aceitosas; en *B. bassiana* se obtuvo el mayor aumento de la efectividad, teniendo una eficacia del 33.33% para las soluciones acuosas y aumentando un 43.3% en las soluciones aceitosas (76.67%), mientras que para los tiempo letal 25, se disminuyeron 2 días para *V. lecanii* (10 a 8 días), 4 días para *H. thompsonii* (14 a 10 días), y para *B. bassiana* paso de un  $TL_{25}$  de 12 días en las soluciones acuosas a 4 días en las soluciones aceitosas, al disminuir el  $TL_{50}$  aumenta la efectividad de nuestro hongo, dado que hay

menor mortalidad en menor tiempo. Estos resultados coinciden con lo dicho por Cazorla Perfetti y Morales Moreno en el 2016 quienes describieron que las ninfas cuarto estadio del *R. prolixus* que eran expuestas a las soluciones aceitosas de *B. bassiana* disminuía su TL50 comparado con lo obtenido para las soluciones acuosas. Estos resultados eran de esperarse debido a que el aceite brinda protección a los hongos contra diversos factores ambientales (como lo son la temperatura, radiación ultravioleta, etc), pero además este incrementa la adhesión a las cutículas y a las membranas Inter segmentales lipofílicas, lo cual ayuda a dispersarse con mayor efectividad en el hospedero (Moslim et al. 2004; Luz y Batagin 2005).

Hay diversos factores que pueden causar la muerte de la ninfa en los bioensayos, dentro de los cuales se encuentra el estrés por causa de un mal manejo de la ninfa (Peng et al. 2002), para verificar que la mortalidad fuera realmente causa por los hongos y no por factores externos se colocaron las ninfas en una cámara húmeda con la finalidad de observar la esporulación, desarrollándose una capa blanquecina algodonosa que cubría principalmente el lugar donde se colocó las soluciones, si bien la observación macroscópica no es suficiente para demostrar que la muerte se deba a los hongo, para comprobar la mortalidad, se realizó un corte histológico de la parte abdominal de la ninfa, en donde se demostró la presencia de penetración por parte de los distintos hongos utilizados, esto fue posible observarse tanto en las ninfa que fueron inoculadas con soluciones acuosas, como las inoculadas con las soluciones aceitosas, dado que se observó la presencia de conidio en el hemocele, esto nos indica que además de haber presentado una adhesión a la cutícula, también hubo un proceso de penetración vía tegumento, lo cual es importante para verificar el proceso de infección por parte de los hongos según lo mencionado por Cazorla Perfetti y Morales Moreno (2011).

Si bien nuestros resultados sobre *B. bassiana* concuerdan con la literatura sobre su uso como una de las mejores opciones como bioinsecticida, ya sea en tanto en su versión acuosa como en su versión aceitosa, cabe mencionar se obtuvieron mejores resultados en las ninfas inoculadas con las soluciones aceitosas. A pesar de la gran efectividad de *B. bassiana* los resultados obtenidos en las soluciones acuosas y aceitosas de los hongos *V.*

*lecanii* y *H. thompsonii* no mostraron una diferencia significativa, por lo que se sugiere estudiar más a profundidad sobre *V. lecanii* y *H. thompsonii*, además que sería conveniente el análisis y obtención de cepas de estos hongos provenientes de *T. infestans*, esto con la finalidad de encontrar una cepa con mayor efectividad, dado que los hongos utilizados para este estudio son comerciales y no aislados de las chinches, el estudio de variante como control biológico es importante, dado que existe una gran posibilidad de que los insectos generen resistencia a *B. bassiana*, debido a que es uno de los hongos más estudiado y se utiliza; no obstante la resistencia presentada por su uso como insecticida, suele ser menor a la resistencia que los triatómidos desarrollan a los insecticidas usualmente utilizados (Dubovski et al. 2013; Al Khuoury et al. 2020).

## 9. Conclusión.

Con estos resultados se demuestra que los *B. bassiana*, *V. lecanii* y *H. thompsonii* hongos tuvieron efectividad contra las ninfas de *T. infestans*. *V. lecanii* tuvo una mayor efectividad en las soluciones acuosas en comparación de *B. bassiana* y *H. thompsonii*, mientras que, en las soluciones aceitosas, *B. bassiana* tuvo mayor efectividad al compararse con *V. lecanii* y *H. thompsonii*.

A partir de nuestros resultados se puede comprobar la efectividad de *B. bassiana* para su uso como biocontrol, además de que nos confirma que *V. lecanii* y *H. thompsonii* tienen un efecto favorable en la mortalidad de las ninfas de primer estadio de *T. infestans*, por lo cual sería muy recomendable realizar estudios a fondo sobre estos hongos.

## 10. Perspectiva.

En el trabajo se demostró que las especies *B. bassiana*, *V. lecanii* y *H. thompsonii* tienen una efectividad contra las ninfas de primer estadio de *T. infestans*, tanto en soluciones acuosas y soluciones aceitosas. Aunque los resultados muestran que *B. bassiana* tiene una mejor efectividad que los *V. lecanii* y *H. thompsonii*, hay que tomar en cuenta que estos últimos no fueron aislados de manera nativa de los triatóminos, mientras que la cepa de *B. bassiana* era de uso comercial para el control de diversas plagas, y se pueden obtener mejores resultados. sería conveniente realizar un muestreo de chinches para buscar aislamientos de *V. lecanii* y *H. thompsonii* nativos de *T. infestans*, además se recomienda conocer los compuestos bioactivos que producen los hongos que actúan en los diversos pasos de infección en las ninfas.

Por último, los ensayos se realizaron con una aplicación directa de las soluciones al abdomen de las ninfas, sin embargo, para una aplicación más realista, sería recomendable realizar experimentos en donde se asperja las soluciones sobre las ninfas, para así asemejar el método cotidiano con el cual se aplican las bioinsecticidas.

## 11. Bibliografía.

- Al Khoury C, Guillot J, Nemer N. 2020. Susceptibility and development of resistance of the mite *Tetranychus urticae* to aerial conidia and blastospores of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Systematic & Applied Acarology* 25(3): 429–443
- Badii MH, Landeros J. 2007. Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *Cultura Científica y Tecnológica (CULCyT)* 19(4): 21-34.
- Bartlett MC, Jaronski ST. 1988. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects. Burge, R.N (ed.). In *Fungi in Biological Control Systems*. Manchester University Press: New York, pp. 61–85.
- Becerril-Flores MA, Valle-De La Cruz A. 2003. Descripción de la enfermedad de Chagas en el Valle de Iguala. *Gaceta Médica de México*. pp. 539-544.
- Carabarin-Lima A, González-Vázquez MC, Baylon-Pacheco L, Rosales-Encina JL. 2011. Enfermedad de Chagas: una enfermedad olvidada. *Elementos* 84: 5-11.
- Cárdenas-Sánchez J, Mazariego M, Ultrilla F, Monteón-Padilla V, Altuzar M. 2003. Anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en pacientes con cardiomiopatía dilatada. *Revista Médica del IMSS; México* 111-114.
- Carrada-Bravo T. 2004. *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev Latinoam Patol Clínica y Med Lab* 51(4):205-219.
- Carruthers RI, Soper RS. 1987. *Fungal diseases* J.R. Fuxa, Y. Tanada (eds.), *Epizootiology of Insect Diseases*, Wiley: New York. pp. 357-416
- Castellanos-Sánchez PL, Paredes Esquivel C, Solís Acosta H, Guevara Saravia M, Huaripaucar M, Gómez Ramírez H. 2003. Aislamiento y determinación de la capacidad biocida de hongos nativos entomopatógenos: *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de *Triatoma infestans*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Perú. Pp. 1 – 14.

Castillo Reyna, J. 2002. Destino del hongo entomopatogeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize y Brown) (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en suelos agrícolas. Universidad Autónoma de Nuevo León: San Nicolás de los Garza. pp. 10.

Cazorla-Perfetti DJ, Morales Moreno P, Quintero MEA. 2007. Efectos de gradientes térmicos, salinos y pH sobre la germinación in vitro de un aislado nativo de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, patógeno para *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata*. RevCient la Fac Ciencias Vet la Univ del Zulia 17(6):627-631.

Cazorla-Perfetti DJ. 2011. El uso de hongos entomopatógenos para el control biorracional triatominae, vectores de la enfermedad de Chagas". Av Cardiol 31(4):333-352.

Cazorla-Perfetti DJ, Morales Moreno P. 2016. Efecto de Formulaciones Acuosas y Aceitosas de 13 Aislamientos Nativos de *Beauveria bassiana* (Ascomycota) sobre *Rhodnius prolixus* (Triatominae) bajo Condiciones Experimentales. Rev Investig Vet del Peru 27(4):771-782.

Concha Valdez FG. 2015. Diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas (Chagas congénito y en donantes de sangre): validación del antígeno Hierro Superóxido Dismutasa excretada (Fe-SODE) de *Trypanosoma cruzi*. Universidad de Granada: Granada.

Chandler D, Davidson G, Jacobson RJ. 2005. Laboratory and glasshouse evaluation of entomopathogenic fungi against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), on tomato, *Lycopersicon esculentum*. Biocontrol Science and Technology 15: 37–54.

Cohen J, Wilson M, Cruz-Celis A, Ordoñez RR. 2006. Infestation by *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Is associated with housing characteristics in rural Mexico. Journal of Medical Entomology 43(6): 1252-1260.

Coura J, Dias J. 2009. Epidemiology, control, and surveillance of Chagas disease-100 years after its discovery. *Mem I Oswaldo Cruz* 1:31-40.

Dubovskiy IM, Whitten MM, Yaroslavtseva ON, Greig C, Kryukov VY, Grizanov EV, Mukherjee K, Vilcinskas A, Glupov VV, Butt TM. 2013. Can insects develop resistance

to insect pathogenic fungi?. PLoS One, 8: e60248.

Flores-Villegas LA, Cabrera-Bravo M, Pérez-Torres A, et al. 2019. Effects on *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) Eggs Exposed to Entomopathogenic Fungi: Exploring Alternatives to Control Chagas Disease. J Med Entomol 56(1):284-290.

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

Goettel M, Inglis GD. 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: Lawrence L, edi. Manual of techniques in insect pathology. Academic Press; San Diego, pp. 213-249.

Gómez-Hernández C, Rezende-Oliveira K, Cortéz- Zárata A, Cortéz-Zárata E, Trujillo-Contreras F, Ramírez L. 2008. Prevalência de triatomíneos (Hemíptera: Reduviidae: Triatiominae) infectados por *Trypanosoma cruzi*: sazonalidade e distribuicao na regioa Ciénega do Estado de Jalisco, México. Revista de la Sociedad Brasileira de Medicina Tropical 41(3):257-262.

Hajek AE, Eastburn CC. 2003. Attachment and germination of Entomophaga maimaiga conidio on host and non-host larval cuticle. J Invert Pathol 82:12-22.

Hegedus DD, Khachatourians GG. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. Biotechnol Adv 13:455-490.

Holder DJ, Kirkland BH, Lewis MW, Keyhani NO. 2007. Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. Microbiology 153:3448-3457.

Hotez P, Bottazzi M, Dumonteil E, Valenzuela J, Kamhawi S. 2012. Texas and México: Sharing a Legacy of Poverty and Neglected Tropical Diseases. PLoS Nerl Trop Dis, e1497.

Quesada-Sojo KA, Rivera-Méndez W. 2015. Aislamiento, identificación y patogenicidad de *Hirsutella* en *Planococcus citri*. Tecnología en Marcha. Edición Especial Biocontrol:

74-84.

Lazzari C, Lorenzo M. 2009. Exploiting triatomine behaviour: alternative perspectives for their control. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1:65-70.

Linn L, Oliel S, Baldwin A. 2019. OPS lanza nueva guía para el diagnóstico y tratamiento del Chagas. Centro de prensa [Online].

Disponible en:

[https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=14906:paho-issues-new-guide-for-diagnosis-and-treatment-of-chagas-disease&Itemid=135&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14906:paho-issues-new-guide-for-diagnosis-and-treatment-of-chagas-disease&Itemid=135&lang=es)

Luz C, Batagin I. 2005. Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*. *Mycopathologia* 160: 51-62.

Luz C, Silva IG, Magalhães BP, Cordeiro CMT, Tigano MS. 1999. Control of *Triatoma infestans* (Klug) (Reduviidae: Triatominae) with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.: preliminary assays on formulation and application in the field. *An da Soc Entomológica do Bras.* 28(1):101-110.

Magallon-Gastelun E, Magdaleno-Peñalosa N, Katthain-Duchateau G, Trujillo-Contreras F, Lozano-Kasten F, Hernández-Gutiérrez R. 1998. Distribution of Chagas disease vectors (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in the state of Jalisco. *Revista Biomedica* 9(3):151-57.

Martínez-Ibarra J, Alejandre-Aguilar R, Paredes-González E, Martínez-Silva M, Solorio-Cibrián M, Noguera-Torres B, Novelo-López M. 2007. Biology of three species of North American Triatominae (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) fed on rabbits. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102(8) 925-930.

Molina-Garza Z, Rosales-Encina J, Galaviz-Silva L, Molina-Garza D. 2007. Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en triatóminos silvestres de Nuevo León, México. *Salud Pública México*, 37-44.

Moslim R, Wahid M, Ahmad S, Kamarudin N. 2004. The effects of oils on germination of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and its infection against the oil palm

bagworm, *Metisa plana* (Walker). J Oil Palm Res 16: 78-87.

Nuñez del Prado E, Iannacone J, Gómez H. 2008. Effect of two entomopathogenic fungi in controlling *Aleurodicus cocois* (Curtis, 1846) (Hemiptera: Aleyrodidae). Chilean Journal of Agricultural Research 68(1): 21-30

Oliveira-Filho AM. 1984. New alternatives for Chagas' disease control. Mem Inst. Oswaldo Cruz 79: 117-123.

PAHO. 2019. Información general: Enfermedad de Chagas. Neglected, Tropical, and Vector Borne Diseases. [Online]. Disponible en:

[https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagasyItemid=40370&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagasyItemid=40370&lang=es)

Peng CSY, Zhou X, Kaya H. 2002. Virulence and site of infection of the fungus, *Hirsutiella thompsonii*, to the honey bee ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. Journal of Invertebrate Pathology 81: 185–195

Prata A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis 1 1(2):92-100.

Pucheta M, Flores A, Rodríguez S, De La Torre M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Interciencia 31:856-860.

Ramsey J, Gutiérrez-Cabrera A, Salgado-Ramírez L, Townsen-Peterson A, Sánchez-Cordero V, Ibarra-Cerdeña C. 2012. Ecological Connectivity of *Trypanosoma cruzi* reservoirs and *Triatoma pallidipennis* hosts in an anthropogenic Landscape with endemic Chagas Disease Plos one, 7(9).

Rocha LFN, Silva IG, Luz C. 2011. Activity of some hypocrealean fungi collected in a Cerrado ecosystem against *Rhodnius* spp. (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. Acta Trop 118(1):63-66.

Romaña CA, Fargues J, Pays JF. 1987. Method of biological control of Triatominae,

vectors of Chagas disease, using entomopathogenic Hyphomycetes. Preliminary study. Bull Soc Pathol Exot Filiales 80(1):105-111.

Salazar-Schettino PM, Bucio-Torres MI, Cabrera-Bravo M, De Alba-Alvarado MC, Castillo-Saldaña DR, Zenteno-Galindo EA, Rojo-Medina J, Fernández-Santos NA, Perera-Salazar MG. 2016. Enfermedad de Chagas en México. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM: 59(3): 1-16.

Schofield, C. 1994. Triatominae: biología y control. West Sussex. Eurocommunica Publications: UK. Pp. 1-78.

St L, Joshi L, Bidochka MJ, Rizzo NW, Roberts DW. 1996. Characterization and Ultrastructural Localization of Chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during Fungal Invasion of Host (*Manduca sexta*) Cuticle. Appl Environ Microbiol 62:907-912.

Sukumar K, Perich M, Boobar L. 1991. Botanical derivatives in mosquito control. J Am Mosq Control Assoc 2: 210–237.

Tanada Y, Kaya H. 1993. Insect Pathology. Academic Press; California, pp.666.

Vásquez CA, Saldarriaga Y, Chaverra D. 2005. Susceptibilidad de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) de V estadio de desarrollo a la acción del hongo *Beauveria bassiana* Susceptibility of fifth instar nymphs of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) to the action of the fungus *Beauveria bassiana*. Rev Colomb Entomol 31(1):15-19.

Vassena C, Picollo M, Zerba E. 2000. Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans*

and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. Med Vet Entomol 14(1):51-55.

Vázquez-Martínez MG, Cirerol-Cruz BE, Torres-Estrada JL, López MHR. 2014. Potential for entomopathogenic fungi to control *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of chagas disease in Mexico. Rev Soc Bras Med Trop 47(6):716-

722.

Vega CS, Náquira VC. 2005. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la trypanosomiosis americana (enfermedad de chagas). Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud: Lima, pp 7.

Velasco-Castrejón O, Rivas-Sánchez B. 2008. Apuntes para la historia de la enfermedad de Chagas en México. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex 65(1):57-79.

WHO. 2019. Chagas disease (American trypanosomiasis). Newsroom, [Online]  
Disponible en: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))

Wraight SP, Jacksonz MA, De Kock SL. 2001. Formulation of Fungal Biocontrol Agents. In: Fungi As Biocontrol (eds). pp. 253.