



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE DOS CEPAS DE *Beauveria bassiana*
(Balsamo) Vuillemin COMO CONTROLADOR BIOLÓGICO DE
Meccus pallidipennis HEMIPTERA: REDUVIIDAE**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLÓGICAS)
CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA:

JUAN CARLOS JAMBOOS TOLEDO

ASESORES:

**Dr. JOSÉ LINO ZUMAQUERO RÍOS
Dr. LUIS ERNESTO FUENTES RAMÍREZ**



PUEBLA, PUE.

DICIEMBRE, 2014

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Microbiológicas, a través del Laboratorio de Microbiología del Suelo, dirigido por el Dr. Luis Ernesto Fuentes Ramírez, por permitirme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y tesis respectivamente en un área de mi profundo interés, importancia y gusto. De igual forma, al Laboratorio de Parasitología y Vectores de la Escuela de Biología, dirigido por el Dr. José Lino Zumaquero Ríos por la propuesta de tesis, orientación y apoyo. Desde luego mi sincero agradecimiento al Centro Nacional de Referencia de Control Biológico - CNRCB/SENASICA, Tecomán - Colima, que encabeza el Subdirector M.C. Hugo César Arredondo Bernal y a través de su Laboratorio de Biología Molecular encargado a la Mtra. Alba Suaste, me apoyaron y contribuyeron en la parte molecular de la investigación. Finalmente, mi enorme agradecimiento a Agroindustria Fungi-Agrícola de Oriente - AFAO, empresa productora de microorganismos benéficos bajo la dirección del Q.F.B. Porfirio Martínez y la Dra. Ofir Saa Barona, quienes no solo me aportaron su calidez humana, experiencia y conocimiento sino que dispusieron de diversos recursos, su laboratorio e instalaciones en donde se realizó la identificación macroscópica, microscópica y cultivo de las cepas aisladas del presente estudio.

RESUMEN

La Tripanosomosis americana, también llamada enfermedad de Chagas, es una enfermedad potencialmente mortal cuyo agente etiológico es el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi* (Kinestoplastida: Trypanosomatidae). Hay zonas endémicas en 21 países de América Latina, donde se transmite a los seres humanos principalmente por las heces de insectos triatominos conocidos como vinchucas, chinches, u otros nombres según la zona geográfica.

En este estudio se aislaron y se caracterizaron molecularmente cepas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, recolectadas de treinta muestras de suelo del sur del Estado de Puebla, localidad de San Juan de los Ríos, municipio de Chiautla de Tapia, para evaluar el potencial entomopatogénico sobre *Meccus pallidipennis* vector de esta enfermedad. Los dos aislados provenientes de las muestras de suelo fueron identificadas por su morfología tanto macro como microscópicamente y posteriormente se realizó la caracterización molecular, obteniendo aislamientos de *B. bassiana*, que finalmente se compararon con las cepas de referencia AFAO IX-5 y CNRCB.

El efecto entomopatogénico de las cuatro cepas de *B. bassiana* sobre *M. pallidipennis* no presentó diferencia estadísticamente significativa entre sí, hecho corroborado por las comparaciones de las secuencias espaciadoras de transcripción interna (ITS por su sigla en inglés) en la base de datos genómica BLAST, la cual arrojó una similitud superior al 98% en las secuencias de ITS.

Los resultados obtenidos de la exposición de *M. pallidipennis* de tercer estadio a las cepas de *B. bassiana* muestran que los dos aislados de suelos del sur del estado de Puebla pueden constituirse como potenciales controladores del vector de la tripanosomosis americana en el mismo estado o aun en regiones con características similares.

Palabras claves: Control biológico, *Beauveria bassiana*, *Meccus pallidipennis*, Tripanosomiasis americana, *Trypanosoma cruzi*,

ÍNDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
1 INTRODUCCIÓN	10
2 MARCO TEÓRICO	12
2.1 La Trypanosomosis americana o enfermedad de Chagas	12
2.1.1 Agente etiológico	13
2.1.2 El vector	14
2.1.3 Ciclo de vida	15
2.1.4 Hábito alimenticio	15
2.1.5 Epidemiología	16
2.1.6 Patología	17
2.1.7 Ecología	17
2.1.8 Triatominos en América	18
2.1.9 Especies distribuidas en el Estado de Puebla	19
2.1.10 Incidencia y prevalencia	19
2.2 Control biológico	19
2.2.1 Hongos entomopatógenos	20
3 ANTECEDENTES	23
4 JUSTIFICACIÓN	25
5 OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo general	26
5.2 Objetivos específicos	26
6 HIPÓTESIS	27
7 DIAGRAMA DE TRABAJO	28
8 MATERIALES Y MÉTODOS	29
8.1 Área de estudio	
8.2 Ubicación geográfica y características edáficas del lugar	29
8.3 Uso del suelo	30
8.4 Clima	30
8.5 Vegetación	30
8.6 Historia	31

8.7 Hidrología	31
8.8 Fauna	31
8.9 Infraestructura social y de comunicaciones	32
8.10 Agricultura y ganadería	32
8.11 Material biológico	33
8.12 Aislamiento de hongos entomopatógenos	34
8.13 Preparación del inóculo	34
8.14 Inoculación de <i>M. pallidipennis</i> con <i>B. bassiana</i>	35
8.15 Identificación fenotípica	35
8.16 Caracterización genotípica	35
8.16.1 Procedimiento	36
8.16.2 Determinación de la concentración de ADN	37
8.16.3 Visualización del ADN en gel de agarosa	37
8.16.4 Amplificación de la región espaciadora de transcripción interna - ITS	38
8.16.5 Purificación y secuenciación de los productos	39
8.16.6 Análisis estadístico	39
9 RESULTADOS	40
9.1 Aislamiento de cepas	40
9.2 Identificación fenotípica	40
9.3 Análisis de las secuencias obtenidas	43
9.4 Mortalidad de Triatomíneos por cepa a diferente dilución cada 24 horas	44
9.5 Procesamiento de datos	45
9.6 Comportamiento entomopatógeno de las cuatro cepas de <i>Beauveria bassiana</i> sobre <i>Meccus pallidipennis</i> de tercer estadio	51
10. DISCUSIÓN	54
11 CONCLUSIONES	56
12 PERSPECTIVAS	57
13 BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXOS	63

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la secuenciación de la región ITS de las cepas Bb1, CNRCB, MucA y AFAO IX-5.	38
Tabla 2. Reactivos y sus cantidades usadas en la amplificación de la región ITS de las cepas Bb1, CNRCB, MucA y AFAO.	38
Tabla 3. Comparación de las secuencias de las cepas Bb1, CNRCB, MucA y AFAO IX-5 en el Programa BLAST 2.0 QBLAST del National Center for Biotechnology Information.	41
Tabla 4. Distancias génicas entre las secuencias ITS de las cepas Bb1, CNRCB, AFAO IX-5 y MucA.	43
Tabla 5. Mortalidad acumulada de las tres repeticiones por cada cepa a las 24 y 48 horas.	44
Tabla 6. Mortalidad acumulada de las tres repeticiones por cada cepa a las 72 y 96 horas.	44
Tabla 7. Número de muertos y porcentaje de mortalidad de cada repetición a las 96 horas.	45
Tabla 8. Transformación arcsen de los porcentajes de mortalidad de cada repetición.	45
Tabla 9. Datos transformados y compilados por repetición de la transformación arcsen.	46
Tabla 10. Número de muertos y porcentaje de mortalidad de cada repetición a las 96 horas.	46

	Página
Tabla 11. Transformación arcsen de los porcentajes de mortalidad de cada repetición.	47
Tabla 12. Datos transformados y compilados por repetición de la transformación arcsen.	47
Tabla 13. Número de muertos y porcentaje de mortalidad de cada repetición a las 96 horas.	48
Tabla 14. Transformación arcsen de los porcentajes de mortalidad de cada repetición.	48
Tabla 15. Datos transformados y compilados por repetición de la transformación arcsen.	49
Tabla 16. Número de muertos y porcentaje de mortalidad de cada repetición a las 96 horas.	49
Tabla 17. Transformación arcsen de los porcentajes de mortalidad de cada repetición.	50
Tabla 18. Datos transformados y compilados por repetición de la transformación arcsen.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Formas parasitarias del género <i>Trypanosoma</i> .	14
Figura 2. Esquema de trabajo.	28
Figura 3. Ubicación del municipio de Chiautla de Tapia, Estado de Puebla.	29
Figura 4. Ubicación de la localidad de San Juan de los Ríos, Municipio de Chiautla de Tapia, Estado de Puebla.	29
Figura 5. Panorámica que muestra la estación seca y de lluvias en la localidad de San Juan de los Ríos. Municipio de Chiautla de Tapia, sur occidente del Estado de Puebla.	30
Figura 6. Ninfa de <i>Meccus pallidipennis</i> de tercer instar.	33
Figura 7. Larvas de <i>Galleria mellonella</i> .	34
Figura 8. Identificación fenotípica microscópica de las cepas de <i>B. bassiana</i> aisladas de suelos de San Juan de los Ríos, Municipio de Chiautla de Tapia, Estado de Puebla.	40
Figura 9. Cultivos de las dos cepas de <i>B. bassiana</i> aisladas de suelos de San Juan de los Ríos, Municipio de Chiautla de Tapia, Estado de Puebla.	42
Figura 10. Corrimiento electroforético de las cepas después de realizada la amplificación.	42
Figura 11. Árbol filogenético que muestra la convergencia genética de las 4 cepas en sus secuencias espaciadoras internas - ITS.	43

	Página
Figura 12. Comportamiento de las cuatro cepas de <i>Beauveria bassiana</i> a partir de las tres repeticiones durante las 96 horas de bioensayo sobre <i>Meccus pallidipennis</i> .	51
Figura 13. Mortalidad de <i>Meccus pallidipennis</i> a cargo de cada dilución de <i>Beauveria bassiana</i> cepa CNRCB a las 24, 48, 72 y 96 horas.	51
Figura 14. Mortalidad de <i>Meccus pallidipennis</i> a cargo de cada dilución de <i>Beauveria bassiana</i> cepa Bb1 a las 24, 48, 72 y 96 horas.	52
Figura 15. Mortalidad de <i>Meccus pallidipennis</i> a cargo de cada dilución de <i>Beauveria bassiana</i> cepa AFAO IX-5 a las 24, 48, 72 y 96 horas.	52
Figura 16. Mortalidad de <i>Meccus pallidipennis</i> a cargo de cada dilución de <i>Beauveria bassiana</i> cepa MucA a las 24, 48, 72 y 96 horas.	53

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades humanas transmitidas por vectores constituyen una parte substancial de la agenda de trabajo del Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales de la Organización Mundial de la Salud OMS (TDR/WHO por sus siglas en inglés). De las diez enfermedades consideradas, seis de ellas son transmitidas por vectores (García, 2011).

Es un problema de salud pública importante en América Latina, por afectar aproximadamente 8 millones de personas en 21 países agravada por la migración humana a regiones donde la enfermedad no es endémica (Rassi, 2010).

La Tripanosomosis americana, también conocida como enfermedad de Chagas, es un padecimiento silencioso, poco conocido, ampliamente distribuido entre la población humana que vive en condiciones de precariedad. Es una zoonosis con una evolución crónica y es causa importante de morbi-mortalidad y disminución de la esperanza de vida de las poblaciones que la padecen.

Es una enfermedad parasitaria causada por un protozooario (Kinetoplastida, Tripanosomatidae) *Trypanosoma cruzi*, parásito con gran preferencia por las células del miocardio, esófago y colon (OMS, 2007).

Guimarães (1985) señala que el 80% de los casos de la enfermedad se deben a la transmisión vectorial. Hoy se manifiesta en algunos países latinoamericanos la importancia de la vía oral como forma de transmisión de la enfermedad dados los brotes epidémicos de los últimos años en Venezuela y Brasil (ProMED-mail 2013); de los infectados el 30% sufrirá afecciones cardiovasculares, gastrointestinales y/o neurológicas irreversibles (Klein, 2012).

De las diversas revisiones bibliográficas de la enfermedad de Chagas publicadas, ninguna se enfoca específicamente en un país (Olivier *et al.* 1972). En el caso del gobierno mexicano y las instituciones académicas que han apoyado la investigación de la enfermedad de Chagas no han presentado datos sobre la situación de esta, a pesar de haberse declarado al menos un caso humano en cada una de las entidades federativas y el Distrito Federal.

Desde el punto de vista climatológico y orográfico, México tiene una gran variedad de hábitats, la biodiversidad de vectores es extensa, los reservorios silvestres y domésticos son también numerosos, estos proporcionan condiciones naturales

para la transmisión, facilitadas con innumerables regiones rurales habitadas por personas que viven en condiciones precarias.

Dada la creciente tasa de infección humana debido a la transmisión sanguínea y el número de artículos sobre genética y biología molecular dentro de la literatura nacional e internacional relacionada a México, se decide investigar sobre este tema con el propósito de continuar enriqueciendo el conocimiento sobre esta enfermedad y las posibilidades de controlarla mediante estrategias, acciones y mecanismos que regulen las poblaciones de Triatomíneos sin perjuicio para la salud humana.

En este contexto, el objetivo central del presente trabajo fue contribuir al control de la enfermedad de Chagas en Chiautla de Tapia, sur del Estado de Puebla, localidad que pertenece a una zona con presencia de *Meccus pallidipennis*, vector de esta enfermedad.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 La Tripanosomosis americana o enfermedad de Chagas

La Tripanosomosis americana o enfermedad de Chagas, también llamada “mal de Chagas-Mazza”, corresponde a una infección parasitaria, sistémica, crónica ocasionada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* (Kinestoplastida: Trypanosomatidae), transmitido por medio de vectores hematófagos (Reduviidae: Triatominae).

Es endémica en 21 países y actualmente existen 65 millones de personas habitando áreas de exposición y en riesgo de contraer esta enfermedad en las Américas de los cuales 20 millones han estado o están en contacto con el parásito, con una incidencia anual de 28 mil casos. 11, 2 millones de personas están infectadas (Schofield 1998), lo que representa una prevalencia media de cerca del 4% de la población total de Latinoamérica, constituyéndose en un gran problema de salud pública en 17 países tanto en áreas rurales como urbanas (Schofield 1994). Es una de las más serias preocupaciones de salud pública en Sur América (Leiby *et al.* 1997).

La mortalidad ha disminuido de manera significativa, la enfermedad sin embargo es causante de alrededor de 12 mil muertes al año. Tiene consecuencias irreversibles en corazón, tubo digestivo y sistema nervioso.

Se considera una enfermedad desatendida, con una firme vinculación con aspectos socio-económico culturales deficitarios.

El principal mecanismo de transmisión es vectorial, por hemípteros (chinchas), de la Subfamilia Triatominae (con alimentación hematófaga). Este parásito es transmitido por medio de insectos hematófagos (Reduviidae: Triatominae) que emiten sus deyecciones durante o recién concluida la ingesta de sangre la cual lleva la fase infectante del parásito que se introduce en la piel que se frota a causa de las picaduras, tejidos lacerados o en discontinuidad dando inicio al proceso de infección.

Las vías de contagio además de la vectorial y en orden de importancia son la transfusional, congénita, por transplantes, la alimentaria y por accidentes de laboratorio. Otras vías de infección son la conjuntival o bucal, en las que el

parásito ingresa al humano cuando este se frota la cara, los ojos o la boca (Hernández, 2000) mientras duerme en la noche.

2.1.1 Agente etiológico

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el protozooario kinetoplastido *Trypanosoma cruzi*, transmitido a través de vectores chupadores de sangre pertenecientes a la subfamilia Triatominae.

Recientemente una nueva nomenclatura de *T. cruzi* ha sido adoptada e incluye seis Unidades Taxonómicas Discretas (DTUs por su sigla en inglés) denominadas como *T. cruzi* I (TcI), *T. cruzi* II (TcII), *T. cruzi* III (TcIII), *T. cruzi* IV (TcIV), *T. cruzi* V (TcV) y *T. cruzi* VI (TcVI) basados en los diferentes marcadores moleculares y características biológicas (Zingales *et al.* 2009).

T. cruzi está conformado de una población heterogénea que exhibe propagación clonal debido a los diferentes ciclos de transmisión, y la posibilidad de recombinación que puede ser encontrada en la naturaleza y previamente reportada *in vitro* (Brisse *et al.* 2001, De Freitas *et al.* 2006 y Gaunt *et al.* 2003).

El ciclo de vida de este parásito incluye diferentes hospederos como el hombre, mamíferos menores e insectos. Estos invertebrados son los vectores biológicos que deyectan el protozooario en sus heces. Una vez dentro del hospedero vertebrado, el parásito adquiere diversas formas durante su ciclo de vida (Figura 1). *i.* El amastigote forma aflagelada que mide entre 2-4 μm . Se divide por fisión binaria e infecta las células de los vertebrados y se obtiene de cultivos en líneas celulares o en los tejidos del huésped; *ii.* El epimastigote que es alargado con longitud de 20 a 40 μm . Tiene un kinetoplasto anterior al núcleo y obtiene en cultivos axénicos y en el intestino del vector; *iii.* El tripomastigote que es una forma móvil y alargada, mide 25 μm de largo y 2 μm de diámetro y tiene el kinetoplasto posterior al núcleo. Se obtiene en las células infectadas de los tejidos y sangre de los mamíferos infectados, en el intestino posterior, heces y orina del vector y en cultivos axénicos (De Souza, 2002; Texeira *et al.*, 2006; Develoux *et al.*, 2009). Los tripomastigotes se replican hasta romper la célula y pasan así al torrente sanguíneo (Montenegro, 1999).

El ciclo de vida del parásito inicia cuando el vector se alimenta de la sangre de un huésped vertebrado infectado e ingiere los tripomastigotes del parásito presentes en la sangre. En el estómago del insecto los parásitos se transforman en

epimastigotes y algunas formas esféricas no específicas que se dividen sucesivamente por fisión binaria y se anclan a las células intestinales por hemidesmosomas. En el recto del vector los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos que son las formas infectantes para el vertebrado (De Souza *et al*, 2002; Texeira *et al*, 2006; Develoux *et al*, 2009). Cuando el vector infectado se alimenta de un nuevo huésped los tripomastigotes salen a través de las heces o la orina y pueden penetrar a los tejidos del huésped por el mismo orificio de la picadura, por escoriaciones en la piel o incluso por mucosas intactas

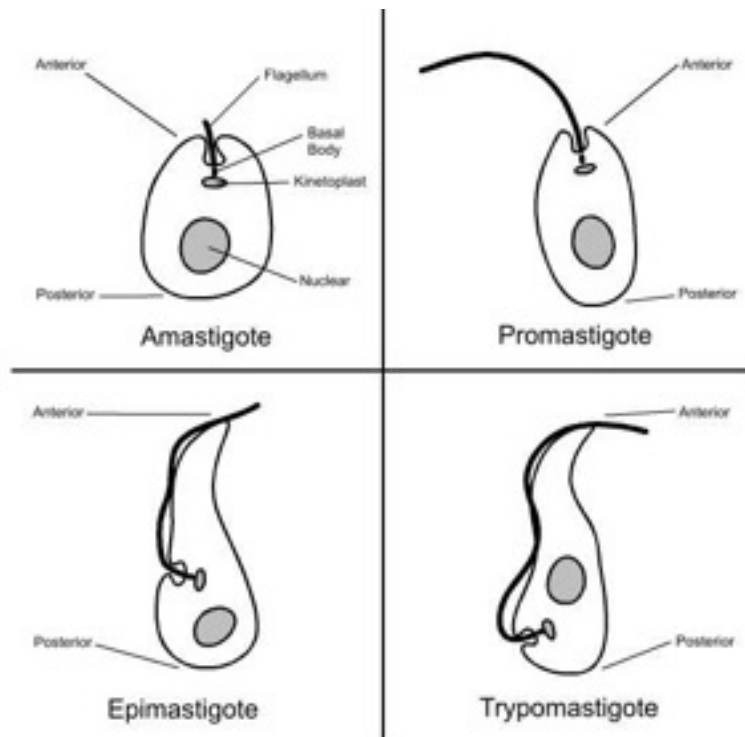


Figura 1. Formas parasitarias del género Trypanosoma. Se observan las formas parasitarias del género Trypanosoma: Amastigote, promastigote, epimastigote, tripomastigote. Fuente: Miles, Michael W.; Ian, Maudlin; Holmes, Peter (2004). The Trypanosomiasis. Wallingford, UK: CABI Publishing. ISBN 0-85199-475-X.

como la conjuntiva. Cuando invaden las células, se transforman en amastigotes inmóviles, que se dividen por fisión binaria hasta que se transforman en tripomastigotes que son liberados al espacio extracelular para alcanzar circulación e invadir tejidos y órganos como corazón, sistema retículo endotelial y plexos del sistema nervioso autónomo (De Souza *et al*, 2002; Develoux *et al*, 2009).

2.1.2 El vector

El vector (Triatomino) pertenece al orden Hemiptera, el cual se caracteriza por poseer aparato bucal tipo succionador. La mayoría son organismos que se alimentan de plantas (fitófagos), algunos otros de insectos (depredadores) y unos pocos de sangre de vectores (hematófagos). En el suborden Heteróptera se encuentra la familia *Reduviidae* y la subfamilia *Triatominae*, única hematófaga en este grupo. De las 124 especies registradas, 111 están restringidas al Nuevo Mundo y 107 se han informado en infecciones naturales y experimentales con *T. cruzi* (Zeledón 1976, Sherlock 1998).

2.1.3 Ciclo de vida

Los triatominos son organismos hemimetábolos cuyo ciclo biológico posee cinco estadios ninfales, todos ellos hematófagos estrictos al igual que los adultos. Su ciclo de vida, por tanto, está condicionado por una monodieta con comidas abundantes seguidas de largos periodos de ayuno. La oviposición comienza a los 10-20 días siguientes a la cópula. Cada hembra puede depositar entre 100 y 600 huevos durante su vida adulta (3-4 meses), dependiendo de la especie y de la cantidad de alimento ingerido. Las ninfas se alimentan de los mismos hospederos que los adultos. Se puede decir que, en condiciones óptimas de laboratorio, la tasa neta de crecimiento de la población puede alcanzar 25 a 50 veces por generación; sin embargo, en la mayoría de las poblaciones domésticas es igual a 1 en promedio (Schofield, 1997).

El estudio sobre el comportamiento de los vectores en zonas endémicas ha conducido, inicialmente, a la simulación de ambientes en el laboratorio y, posteriormente, al estudio de la densidad en poblaciones domésticas. Esto último hace referencia a los cambios en la tasa de reproducción de las hembras y al balance nutricional de los insectos como parte importante en el desarrollo de huevo a adulto (Schofield, 1997).

2.1.4 Hábito alimenticio

Según Schofield (1998), la regulación natural del tamaño de la población de triatominos depende de la densidad de sus huéspedes vertebrados. A medida que aumenta el tamaño de la población y que una mayor cantidad trata de alimentarse de un número fijo de huéspedes, éstos se irritan cada vez más y hay mayor probabilidad de que los insectos interrumpan su alimentación antes de llenarse

completamente. De manera típica, los triatominos tardan entre 10 y 20 minutos en alimentarse totalmente. El volumen de sangre que ingieren las ninfas puede ser de 8 a 9 veces su peso corporal. Sin embargo, en adultos puede ser de 2 a 4 veces. Existe evidencia procedente de experimentos en animales de laboratorio y voluntarios humanos de que el hospedero reacciona con irritación creciente de acuerdo con el número de chinches que se alimentan (Schofield, 1986, Wier, 1982). A consecuencia de la agitación del hospedero, los insectos cesan la alimentación antes de lograr la completa ingesta. Tal regulación densodependiente del tamaño de la ingestión de sangre parece representar un factor clave que influye en la regulación del tamaño de la población y la dispersión de los adultos (Schofield, 1994). Así, a medida que aumenta la densidad, cada triatomo ingiere cantidades de sangre progresivamente menores. La reducción de la condición nutritiva tiene tres consecuencias principales: 1. La velocidad del desarrollo de la ninfa disminuye, reduciendo la velocidad de paso a los estadios siguientes, de manera que las hembras emergen más lentamente, 2. Las hembras ingieren menos cantidad de sangre, depositando por ende menos huevos, y 3. La reducción de la ingesta de sangre por parte de los adultos machos y hembras tiende a aumentar la probabilidad de que inicien un vuelo disperso, lo cual permite la invasión de sitios alternativos, como las viviendas humanas.

Otra consecuencia de la oportuna disponibilidad de sangre es la deyección durante o posterior a la ingestión. Los cambios densodependientes del comportamiento de alimentación de los insectos influyen en el momento de deyección y la dinámica de transmisión de *T. cruzi* (Schofield, 1997), lo cual puede afectar la probabilidad de infección, ya que los vectores más eficaces son los que defecan mientras están aún en contacto con el hospedero. Sin embargo, el momento de la deyección depende tanto de la especie como de la densidad, así como de la cantidad de sangre ingerida. Los triatominos que ingieren poca sangre tienden a deyectar más tarde que los que toman cantidades mayores (Krik, 1987, Trumper, 1991).

2.1.5 Epidemiología

Por su importancia epidemiológica, se destacan aquellas conocidas como domiciliarias o que invaden el peridomicilio humano: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma maculata*, *Triatoma venosa* (Corredor et al., 1990), *Rhodnius pallescens* (Moreno, 1995) y *Panstrongylus geniculatus* (Wolff et al., 1994).

El hombre y más de 150 especies de animales domésticos y salvajes (cánidos, felinos, roedores, marsupiales, edentados y quirópteros) actúan como reservorios del parásito a partir de los cuales se infecta el vector; y de ser primitivamente una zoonosis causada por *Tripanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*, que inicialmente se transmitía principalmente entre pequeños mamíferos salvajes, pasó a los animales domésticos y a los seres humanos a través de triatominos, insectos del orden Hemiptera, Reduviidae, subfamilia Triatominae, principalmente los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*; vectores ampliamente distribuidos en regiones tropicales y subtropicales en el continente americano desde el sur de los estados Unidos de América hasta el sur de Chile y Argentina. De esta manera, ocurren ciclos domiciliarios en el cual la participación humana es fundamental y ciclos silvestres con exclusión total del hombre en la cadena epidemiológica.

Los triatominos colocan hasta 300 huevos durante toda su vida que tiene una duración aproximadamente de 400 días y se desarrollan a través de 5 estadios ninfales (ninfas I; II; III; IV y V) desde el huevo hasta alcanzar el estado adulto. Son insectos hematófagos obligados y chupan sangre desde el estadio I, contagiándose con *T. cruzi* desde un animal o humano infectado y una vez en el insecto, el *T. cruzi* permanece en su intestino de por vida.

2.1.6 Patogenia

La relación parásito-hospedero presenta múltiples variaciones, en intensidad y forma, relacionadas con la antigüedad de la interacción entre las especies participantes. Los principales procesos que *T. Cruzi* induce en vertebrados son:

- Respuesta inflamatoria
- Lesiones celulares
- Fibrosis

Estas lesiones son secuenciales e interrelacionadas, ocurren en numerosos órganos o tejidos pero con mayor frecuencia e importancia en corazón, tubo digestivo y sistema nervioso.

2.1.7 Ecología

Hoy se acepta que la tripanosomiasis americana se estableció como una zoonosis que involucra a triatominos y roedores pequeños de los valles andinos. Las civilizaciones precolombinas, al trabajar la tierra, destruyeron los ecotopos naturales, construyendo a la vez ecotopos alternativos en las viviendas humanas,

que ofrecían refugio y alimento permanente. Así, algunas especies oportunistas, capaces de invadir y colonizar los domicilios, incorporaron al hombre en el ciclo de *T. cruzi*. Testimonio de este establecimiento de la antroponosis sería el hallazgo de antígenos de *T. cruzi* en momias del imperio incaico (Guhl *et al.* 1997).

2.1.8 Triatominos en América

Rhodnius prolixus es la especie de mayor importancia desde el punto de vista epidemiológico, debido a la frecuencia con que coloniza el domicilio humano y al alto porcentaje de infección por *T. cruzi*. Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en el norte de Sur América (Corredor *et al.*, 1990).

Hasta ahora se han reconocido más de 140 especies de Triatominae a las que se agrupan en cinco tribus y diecisiete géneros. De éstas, 127 están presentes solo en el continente americano (Schofield, 2009).

En el continente americano, los Triatominae están distribuidos ampliamente desde los grandes lagos de América del Norte (aproximadamente 42°N) hasta el sur de la Patagonia (aproximadamente 46°N). Típicamente ocupan hábitats silvestres tales como nidos de mamíferos pequeños, madrigueras de zarigüeyas, hoyos de armadillos y nidos de algunas especies de aves. Las especies del género *Rhodnius* también habitan comúnmente en las coronas de palmeras. Las especies que tienen una importancia epidemiológica son aquellas que colonizan casas en zonas urbanas o periurbanas (especialmente *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *T. dimidiata*), y aquellos que entran ocasionalmente en contacto con las personas, por ejemplo que entran volando en la noche (Schofield, 2009).

Los Triatominos se encuentran principalmente en América Latina, en donde algunas especies se han adaptado a vivir con humanos, habitando diferentes hábitats del peridomicilio. Las especies de Triatominae más íntimamente asociadas a hábitats domésticos especialmente *Triatoma infestans* en los países del cono sur, y *Rhodnius prolixus* en algunas zonas de Venezuela, Colombia y Centro América, constituyen los principales vectores domésticos de *T. cruzi* (Schofield, 2009).

Son vectores de la enfermedad de Chagas los Triatominos, conocidos comúnmente en México como chinches. 130 especies se han reportado en América Latina, (Schofield, 1994; Jurberg, 2003; Lent y Wygodzinski, 1978), 32 de las cuales pertenecen al complejo *Meccus phyllosoma*, conformado en territorio

mexicano, cuatro de ellas específicamente en Puebla. (Vidal 2000): *Meccus bassolsae*, *Meccus pallidipennis*, *Triatoma barberi* y *Triatoma dimidiata* (Zumaquero *et al.* 2005). Estos insectos hematófagos se reproducen fácilmente y colonizan con frecuencia las viviendas, sobre todo del medio rural (Zeledón, 1981). Presentan adaptaciones que incluyen modificaciones de la boca, de la saliva y de las funciones digestivas, lo que significa que probablemente tengan su origen evolutivo en distintos depredadores (Salazar *et al.*, 2005).

2.1.9 Especies distribuidas en el estado de Puebla

Meccus pallidipennis es la especie más abundante en el estado de Puebla, se alimenta de la sangre que toma de los animales de corral, conejos, gallinas, así como de cerdos, vacas, caballos y del hombre. Presenta un ciclo de vida similar a otras especies de Triatominos como *Triatoma barberi*, *Meccus bassolsae* y *Triatoma dimidiata*. Predomina principalmente en el Sur del estado de Puebla en el peridomicilio alimentándose de la sangre de humanos, aves de corral y otros vertebrados

2.1.10 Incidencia y Prevalencia

Es una de las principales enfermedades transmitidas por insectos en América Latina. Es endémica en varios estados de México. En este país, la seroprevalencia es de 1,5% en donantes de sangre y asciende al 20% en la población de algunas regiones. Además, en los últimos años se han diagnosticado varios casos de la enfermedad (Magallón, 2006).

2.2 Control biológico

Control biológico es la manipulación intencional de las poblaciones de los enemigos naturales de los insectos plaga para limitar su población. A estos organismos se les llama agentes de control y entre ellos se encuentran insectos depredadores y parásitos, así como microorganismos patógenos de insectos. Las formulaciones comerciales de los microorganismos son conocidas como bioinsecticidas e incluyen a diferentes géneros y especies de bacterias, hongos, nemátodos y virus. Estos microorganismos, denominados entomopatógenos, son específicos: afectan sólo a determinados grupos de insectos (hospederos) y son inofensivos para insectos benéficos, humanos y otros organismos superiores (Torres *et al.*, 2002).

Las enfermedades vinculadas a vectores como la malaria, el dengue, la fiebre amarilla y la esquistosomiasis son la causa de incontables padecimientos y muertes en todos los países en vías de desarrollo. (Flores *et al.*, 2001). Desde el siglo XIX, científicos europeos y norteamericanos empleaban depredadores naturales y patógenos para protegerse de estos organismos, obteniendo resultados muy alentadores. Estas investigaciones perdieron importancia entre 1930 y 1940 al descubrirse los insecticidas químicos, de acción más rápida y con un espectro de acción más amplio que los enemigos naturales de los insectos (Torres *et al.*, 2002). Actualmente, se promueve el manejo integrado de otras formas de control, efectivas y menos contaminantes, como trampas, plásticos y el control biológico (Landa y Osborne, 1992).

2.2.1 Hongos entomopatógenos

Hay más de 100,000 especies de hongos de las cuales unas 750 han sido identificadas como patógenos de insectos (Ferron, 1978; Boucias y Pendland, 1991; Glare y Milner, 1991; Khachatourians, 1991; Hajek y St. Leger, 1994; Moore-Landecker, 1996; Bidochka *et al.* 2000), pertenecientes a unos 90 géneros (Khachatourians, 1991). Los hongos entomopatógenos son aquellos hongos que causan la muerte prematura de un insecto huésped (Glare y Milner, 1991).

Los primeros microorganismos que se encontraron causando enfermedad en insectos, fueron los hongos, por su crecimiento macroscópico sobre la superficie de sus hospederos. La mayoría son patógenos obligados o facultativos y algunos otros son simbióticos. Su crecimiento y desarrollo están limitados principalmente por las condiciones ambientales externas, en particular, alta humedad y temperatura adecuada para la esporulación y germinación de esporas. Las enfermedades causadas por estos hongos son denominadas “micosis” (Tanada y Kaya, 1993).

Según la clasificación taxonómica hecha por Ainsworth (1973), separa a los hongos en dos divisiones: Myxomycota por formar plasmodios y Eumycota por no formarlos y ser frecuentemente miceliales. Los hongos entomopatógenos se encuentran en la división Eumycota y en las subdivisiones: Mastigomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina (Tanada y Kaya, 1993).

La mayoría de los hongos entomopatógenos presentan una morfología multicelular y son denominados filamentosos, los cuales representan el crecimiento más típico

de los hongos microscópicos. Producen colonias algodonosas o pulverulentas. En la mayoría de éstos las hifas son tabicadas y presentan septos que delimitan las diferentes células. Estos hongos son aerobios y sus requerimientos de temperatura oscilan entre 10°C y 40°C. Así mismo, crecen en un rango de pH de 2 a 9. La mayoría presentan reproducción sexual (teleomorfo o meiospórico) y asexual (anamorfo o mitospórico). Estos hongos producen millones de esporas, cada una con la capacidad para desarrollar una nueva colonia. Las esporas sexuales se producen tras la fusión de los núcleos de dos hifas sexualmente compatibles y posterior meiosis. La morfología de las esporas sexuales es muy variada y tiene gran interés para la identificación fúngica, ya que presentan diferencias características (Elósegui y Carr, 2003).

Los hongos entomopatógenos infectan individuos en todos los órdenes de insectos; comúnmente dentro de los grupos Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Himenoptera y Orthoptera. (Tanada y Kaya, 1993; Ferrón *et al.*, 1975). En algunos órdenes de insectos los estadios inmaduros (ninfas o larvas) son más a menudo infectados que los maduros o estado adulto, en otros puede suceder lo contrario. Los estados de huevo y pupa no son frecuentemente infectados por los hongos (Tanada y Kaya, 1993).

De los hongos entomopatógenos identificados en más de 750 especies, solo unas pocas se usan comercialmente, entre los que se encuentran *Beauveria* spp., *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii* e *Isaria fumosoroseus* (Goettel y Toohey, 1983).

Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin es un agente de control biológico para artrópodos plaga (Peteira et al. 2011). Es un hongo deuteromiceto que crece de forma natural en los suelos de todo el mundo. Su poder entomopatógeno le hace posible parasitar a insectos de diferentes especies causando la conocida enfermedad blanca de la muscardina. Pertenece a los hongos entomopatógenos y actualmente es utilizado como insecticida biológico o biopesticida controlando un gran número de parásitos de diversas especies vegetales y vectores de importancia epidemiológica. Es cosmopolita, es decir, se encuentra distribuido en todo el planeta, por lo que es considerado uno de los entomopatógenos de más amplio espectro (Duran, 2002).

El desarrollo de *B. bassiana* sobre insectos puede ser dividido en nueve etapas: (1) Adhesión de la conidia a la epicutícula del insecto, (2) Germinación de la unidad infectiva sobre la cutícula, (3) Penetración en la cutícula del insecto por el tubo germinativo, (4) Producción de metabolitos tóxicos, (5) Muerte del hospedero,

(6) Multiplicación en fase de levadura o cuerpos hifales en el hemocele, (7) Crecimiento en la fase micelial con invasión de todos los órganos del hospedero, (8) Desarrollo del hongo en el interior con emersión del insecto y (9) Producción de unidades infectivas en el exterior del insecto (Roberts, 1981).

Aunque en la literatura también se reporta este proceso micótico infectivo dividido en tres fases: (1) Adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto, (2) Penetración en el hemocele y (3) Desarrollo del hongo. Lo cual generalmente resulta en la muerte del insecto (Samson *et al.*, 1988).

El primer contacto que hace la espora con la superficie del hospedero es por la cutícula. La penetración de ésta por conidias germinadas, ocurre como resultado de una combinación entre la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica por el tubo germinal (Gillespie, 1988). El modo de penetración principalmente depende de las propiedades de la cutícula, grosor, esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales (Charnley, 1984). Los hongos pueden infectar insectos a través de la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas de un insecto. En algunos casos, la digestión de estructuras fúngicas puede causar la muerte por toxicidad más que por micosis (Charnley, 1984).

La producción de hongos entomopatógenos se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas en un sustrato (Monzón, 2001).

3. ANTECEDENTES

En el sur del estado de Veracruz, Tabasco, Campeche y al sureste de México, los niveles de uso de plaguicidas para el control vectorial son del 7% del volumen total de los aplicados en el Golfo de México, donde todavía se aplican plaguicidas de alto riesgo, como DDT. La solución a este tipo de problemas, es la introducción de programas de control de vectores con organismos benéficos o entomopatógenos (Goettel, 1987).

Con este fin, Goettel *et al.* (1984) realizaron estudios sobre mosquitos con el hongo *Culicinomyces clavisporus*. Aislaron el Hyphomycete de la larva *Culiseta inornata* colectada de un estanque localizado en Alberta, Canadá, comparándolo con otros que se hicieron en USA y Australia. Dichos hongos se cultivaron en medio sólido y se observó la tasa de crecimiento, la morfología de la colonia y la pigmentación, estas mismas características se observaron en cultivo líquido. Los aislamientos hechos en Canadá y Australia resultaron ser más semejantes entre sí que los realizados en América. En los tres aislamientos se observaron por microscopía electrónica, conidios de dos tallas diferentes.

Goettel (1987) realizó un estudio para determinar la patogenicidad del hongo *Tolipocladium cylindrosporum* en las larvas de *Aedes aegypti*, *A. vexans* y *Culiseta*. Los experimentos consistieron en la exposición continua de larvas a 5 concentraciones diferentes de conidios a 10, 15, 20 y 25 °C. Las tres especies fueron susceptibles a las diferentes temperaturas. Se determinó que generalmente existía una relación entre la dosificación y la patogenicidad. Sin embargo, las relaciones entre la mortalidad eran muy lineales.

López *et al.* (1999) realizó un trabajo cuyo objetivo fue contribuir al conocimiento de los hongos patógenos de mosquitos, ampliando la distribución y el rango de hospedadores del hongo *Leptolegnia chapmanii*, generando una nueva cita para la región neotropical. Obtuvieron resultados a partir de las pruebas de patogenicidad en larvas de mosquitos, que fueron de un 100% de mortalidad en individuos tratados con *L. chapmanii*, dentro de las 24 horas posteriores al tratamiento; en todas ellas fue comprobado por observación microscópica que la acción del hongo fue la causa de su muerte y además fueron utilizadas en aislamientos en medio de cultivo HMDP para comprobar la viabilidad del hongo. No se registró mortalidad en las larvas testigo.

Carreño (2003), determinó la patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos de las especies *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* e *Isaria fumosoroseus*, sobre huevos, ninfas y adultos de *Aleurotrachelus socialis* bajo condiciones de invernadero. Establecieron la concentración letal cincuenta y noventa del aislamiento más virulento sobre adultos y el estado de desarrollo de *Aleurotrachelus socialis* más susceptible a los hongos entomopatógenos. El aislamiento de *V. lecanii* fue seleccionado como el aislamiento más promisorio para el control de *A. socialis* por presentar los niveles mayores de infección sobre los diferentes estados de desarrollo del insecto, alcanzando su CL50 a una concentración de 1.4×10^7 conidios/ml y su CL90 a una concentración de 2.3×10^{12} conidios/ml.

Enríquez y Chanquin (2003), evaluaron la virulencia de diferentes cepas de hongos entomopatógenos en *Triatoma dimidiata* para su uso como control biológico. Realizaron bioensayos para determinar la virulencia de cuatro cepas de *Metarhizium anisopliae* y tres cepas de *B. bassiana*. Seis de las siete cepas mostraron patogenicidad con una mortalidad acumulada del 100%. El Tiempo en que muere el 50% de los individuos (LT50) varió entre 5.2 y 7.4 días para las seis cepas.

Christhian Luz *et al.* (1998), probó 23 aislados de *B. bassiana* y 13 de *M. anisopliae* en ninfas de tercer estadio de *T. infestans*, importante vector de la enfermedad de Chagas. Las pruebas de patogenicidad en humedad saturada mostraron que este insecto es muy susceptible a la infección fúngica, mientras que con humedad relativa menor (50%), las condiciones esperadas en el microhábitat y virulencia fueron significativamente diferentes entre los aislados. Aun así, la mortalidad acumulada 15 días después del tratamiento varió de 17.5 a 97.5% y estimó que el tiempo de sobrevivencia del 50% varió de 6 a 11 días. Mantuvo la humedad relativa baja para cuatro aislados de *B. bassiana* y para dos de *M. anisopliae* que fueron seleccionados para el respectivo análisis de virulencia a diferentes concentraciones conidiales y temperaturas. En este trabajo, las concentraciones letales suficientes para matar al 50% de los insectos (CL₅₀) varió de 7.1×10^5 a 4.3×10^6 conidias/ml, para un aislado de *B. bassiana* y uno de *M. anisopliae*, respectivamente. La mayoría de sus aislados, principalmente los de *B. bassiana* CG 24 y *M. anisopliae* CG 306, mostraron ser más virulentos a 25 y 30°C, comparado con los 15 y 20°C.

4. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas en América Latina tiene gran impacto económico y en México no existen protocolos estandarizados para el diagnóstico, vigilancia, prevención y control del padecimiento

A pesar de que los insecticidas químicos usados han permitido un control eficaz de vectores y de insectos plaga, no dejan de ser compuestos altamente perjudiciales para la salud humana y los ecosistemas. Además, favorecen la selección de insectos resistentes a ellos, promoviendo el uso de dosis cada vez mayores o productos más tóxicos. El reto es diseñar métodos biológicos, alternativos a los insecticidas químicos, amigables para la naturaleza.

Los hongos entomopatógenos surgen como alternativa de control de estos vectores, a los que se les debe el 80% de la transmisión de esta incurable enfermedad y debido a que no existen vacunas para evitarla es preponderante la efectiva eliminación de las poblaciones domésticas y peridomésticas de triatomíneos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Aislar y caracterizar molecularmente cepas de *Beauveria bassiana* del sur del Estado de Puebla, para evaluar su potencialidad entomopatógeno sobre *Meccus pallidipennis*.

5.2 Objetivos Específicos

Aislar e identificar morfológicamente cepas de *Beauveria bassiana* que se encuentran en suelos de San Juan de los Ríos, Chiautla de Tapia, Estado de Puebla, zona con altos índices de colonización por triatominos.

Evaluar el efecto entomopatogénico de las cepas aisladas para el control de los vectores de la enfermedad de Chagas.

Determinar la mortalidad de Triatominos de tercer estadio en condiciones de laboratorio expuestos a diferentes diluciones de las cepas aisladas de *Beauveria bassiana* para seleccionarlas como potenciales controladores de los vectores de la enfermedad de Chagas.

6. HIPÓTESIS

Existen cepas de hongos entomopatógenos capaces de formar parte de programas de control integrado de vectores para reducir las poblaciones de Triatomíneos en el sur del Estado de Puebla.

7. DIAGRAMA DE TRABAJO



Figura 2. Esquema de trabajo

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Área de estudio

El estado de Puebla está entre los cinco estados más poblados de los treinta y uno del país. Se ubica en la zona centro-oriental de la república. Limita al este con el estado de Veracruz; al oeste con el estado de México, Hidalgo, Tlaxcala y Morelos y al sur con los estados de Oaxaca y Guerrero. Presenta un relieve muy accidentado. La superficie es de 34,251 Km² (Gobierno del Estado de Puebla, 1988).

8.2 Ubicación geográfica y características edáficas del lugar



En este estudio se tomaron muestras de suelo de la localidad de San Juan de los Ríos, municipio de Chiautla de Tapia, Estado de Puebla. Como también la ubicación geográfica y características edáficas del lugar. La Unidad de Manejo Ambiental (UMA) se localiza a 20 Km del Municipio de Chiautla de Tapia en el Estado de Puebla, con coordenadas 18° 11' 50" latitud y 98° 29' 57" longitud.

Figura 3. Ubicación del municipio de Chiautla de Tapia, Estado de Puebla



Figura 4. Ubicación de la localidad de San Juan de los Ríos, municipio de Chiautla de Tapia, Estado de Puebla

8.3 Uso del suelo.

Su uso es para ganadería. Los suelos predominantes son feozem háplico de textura media, el grado de erosión es baja en el 10% del predio (INEGI, 2000).

8.4 Clima

Es semiseco, muy cálido $BS_1(h')w(w)$, con lluvias en verano y precipitación menor a 5mm en el invierno. La temperatura oscila entre 14°C y 39°C. La precipitación está comprendida entre los 600 - 900mm. La altura sobre el nivel del mar es de 650 a 1500m (INEGI, 1987).

8.5 Vegetación

En Puebla, la selva baja caducifolia se localiza principalmente en el Valle de Matamoros, Chiautla, en el Occidente del Valle y de la Sierra de Acatlán (COPLAMAR, 1978). Se caracteriza por su fenología marcadamente estacional, que da como resultado un aspecto diferente de vegetación, de acuerdo la época del año. Durante las lluvias, la selva reverdece con una densa producción foliar, en las primeras semanas de la temporada seca, los elementos arbóreos empiezan a dejar caer sus hojas a ritmos diferentes de acuerdo a la especie y con las condiciones de microhábitat. Consecuentemente, en esta época se indica la verdadera diversidad de esta vegetación que en plena temporada seca casi no se aprecia por su aspecto uniforme (Challenger, 1998; Rzedowky, 1986).

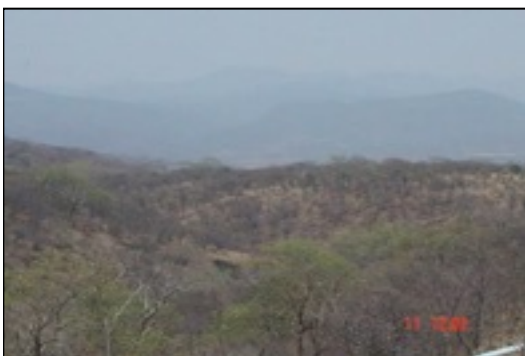


Figura 5. Panorámica que muestra la estación seca y de lluvias en la localidad de San Juan de los Ríos. Municipio de Chiautla de Tapia, sur occidente del Estado de Puebla.

Hacia finales de la época seca, solamente permanecen pocas especies siempre verdes. La altura arbórea es por lo común de 8 a 15m (COPLAMAR, 1978). Las especies vegetales más representativas son: chupandia o coco (*Cyrtocarpa proce-*

ra), palo blanco o palo tolote (*Conzattia multiflora*), palo blanco o cuajilote (*Acacia acatlensis*), cuajote colorado (*Bursera morelensis*), cuajote amarillo (*B. fagaroides*), copal (*B. bipinnata*, *B. excelsa*), linaloe (*B. aloexylon*), pochote (*Ceiba parvifolia*), entre otros (Challenger, 1998; COPLAMAR, 1978).

8.6 Historia

Es una región en la que habitaron grupos de distinta filiación étnica desde 3,000 años a. C. Esto se debió a su posición geográfica, limítrofe con pueblos de la Mixteca de Oaxaca, Tlapanecos de Guerrero, Tlahuicas de Morelos y Nahuas de Puebla. Los Olmecas fueron de los primeros pobladores que se establecieron en los márgenes de los ríos Atoyac y Mixteco (Nahuituxco y San Juan del Río), lugares donde hoy en día se encuentra la comunidad del presente estudio. Actualmente se pueden encontrar vestigios arqueológicos inexplorados. En documentos de 1792 de Congregaciones pertenecientes al Municipio de Chiautla hay registros de la existencia de San Juan de los Ríos en donde se menciona pudo haber sido fundada después de 1571. Para 1777 el padrón de la Parroquia de Chiautla muestra 768 familias de indios, en su mayoría mulatos (Gerhard, 1986).

8.7 Hidrología

Los ríos Atoyac y Mixteco se unen en la parte sureste del poblado, a esto se debe el nombre de San Juan de los Ríos. En la parte baja, en la ribera del río Atoyac es donde se localiza la comunidad (COPLAMAR, 1978).

8.8 Fauna

Existe una gran variedad de especies, como el armadillo (*Dasypus novemcinctus*), liebre torda (*Lepus callotis*), ardilla (*Sciurus aureogaster*), mapache (*Procion lotor*), coatí o tejón (*Nasua nasua*), puma o león (*Puma concolor*), lince rojo o gato montés (*Lynx rufus*), zorra gris (*Urocyon cineroargenteus*), coyote (*Canis latrans*), conejo (*Sylvilagus sp.*), venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), chachalaca (*Ortalis poliocephala*), codorniz listada (*Philortyx fasciatus*), codorniz común (*Colinus virginianus*), aura (*Cathartes aura*), zopilote (*Coragyps atratus*), palomas (*Columbina sp.*, *Zenaida sp.*), halcón cola roja (*Buteo jamaicensis*), caracara común (*Polyborus plancus*), chachalaca (*Calocitta formosa*), víbora de cascabel (*Crotalus sp.*), víbora sorda (*Pitouphis depei*), mazacuata (*Boa constrictor*), ratonera (*Masticophis mentovarius*), coralillo (*Micrurus laticollaris*), iguana negra (*Ctenosaura pec-*

tinata), camaleón (*Phrynosoma* sp.), escorpión (*Heloderma horridum*), sapos (*Bufo* sp.), ranas (*Hyla* sp., *Rana* sp.), entre otras (Ceballos y Galindo - Leal, 1984).

8.9 Infraestructura Social y de Comunicaciones

En la comunidad existe un jardín de niños, una primaria, una tele secundaria, un Centro de Salud (SSA) con un médico y una enfermera para consulta externa sin un servicio constante, obligando el traslado a la cabecera municipal donde se ofrece servicio de medicina interna, hospitalización por parte del ISSSTE, ISSS-TEP e IMSS (INEGI, 2000).

El 59.6% de la población cuenta con acueducto, el 15% tienen drenaje y el 82.6% tiene electrificación. Tienen acceso a la señal de televisión y teléfono vía satélite y señal de radio (COPLAMAR, 1978; INEGI, 2000).

El acceso a la comunidad se hace al Sur de Puebla por la carretera federal 190 de Izúcar de Matamoros, tomando la carretera estatal a Chiautla a través de una carretera de aproximadamente 14 km asfaltada en 2010.

En el sector primario se encuentran actividades como: ganadería, agricultura, apicultura, horticultura y fruticultura, representando el 43.5% de las actividades del Municipio. El sector secundario abarca el 19.8% con actividades como la minería y la industria. En el sector terciario se encuentran actividades como el comercio, servicios y turismo con el 33.6% de actividades a nivel municipal (INEGI, 1998).

8.10 Agricultura y Ganadería

El 22.67% de la superficie del Municipio de Chiautla es utilizado para la agricultura que en su mayoría es maíz (*Zea mays*), frijol (*Phaseolus* sp.), cacahuete (*Arachis hipogea*) y haba (*Vicia faba*), todas temporales y de uso comestible. El 2.21% de la superficie municipal es de pastizales de navajita (*Bouteloua* sp.) para forraje. El 14.58% es de encinos (*Quercus* sp.) son de uso maderable, el restante 58.52% es de selva con predominancia de diferentes especies de copales (*Burseras*) para sombra, ceiba (*Ceiba pentandra*) para sombra, tepehuaje (*Lysiloma* sp.) del cual se recolectan los frutos (INEGI, 1998).

En la actividad ganadera, se cría el ganado bovino, caprino, ovino, asnal, mular y cunícola. En aves se cría el pato, el ganso y la paloma, también se crían aves que producen cantidades considerables de huevos (COPLAMAR, 1978).

8.11 Material biológico

Se emplearon tres especies biológicas en el desarrollo de este estudio. En principio, *Galleria mellonella*, Lepidoptera, en cuyas larvas se desarrollaron los aislados de *Beauveria bassiana* a partir de las muestras de suelo recolectadas de la localidad de San Juan de los Ríos, Municipio de Chiautla de Tapia, Estado de Puebla, y ninfas del hemíptero *Meccus pallidipennis*, usadas para llevar a cabo el bioensayo en laboratorio y determinar su letalidad a diferentes diluciones de esporas de *Beauveria bassiana*.



Figura 6. Ninfa de *Meccus pallidipennis* de tercer instar.

Tanto las larvas del lepidóptero *G. mellonella* como las ninfas del hemíptero *M. pallidipennis* se obtuvieron de las colonias que posee el laboratorio de Parasitología y Vectores de la Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Además, este estudio involucró dos aislados de *B. bassiana*, la cepa AFAO IX-5 proporcionada por Agroindustria Fungi-Agrícola de Oriente - AFAO y la cepa CNRCB del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, dependencia del SENASICA cuya misión es desarrollar y establecer estrategias de control biológico para plagas reglamentadas, por esto genera y proporciona tecnología alternativa al uso de plaguicidas químicos. Coadyuva con programas o campañas fitosanitarias que promueven el uso de organismos benéficos como agentes de control biológico (SENASICA, Agosto 2014). Estas dos cepas se utilizaron como control del efecto entomopatógeno entre estas y los dos aislados de suelos del Municipio de Chiautla de Tapia.

Galleria mellonella es la polilla de la cera, pertenece al orden Lepidoptera, de la familia de los pirálidos (*Pyralidae*). Mariposa crepuscular o nocturna, el adulto es de aproximadamente 2cm, es plaga de los apicultores durante su estadio larvario (Pollard y Yates, 1993). Es muy utilizada en los estudios de patología y fisiología de los insectos (Stefanescu, 2000), por su viabilidad ante condiciones adversas, ser altamente prolífica y con adaptabilidad a las condiciones de laboratorio (Smith, 1937).

8.12 Aislamiento de hongos entomopatógenos

Cada muestra fue colectada de suelos de la localidad de San Juan de los Ríos, Municipio de Chiautla de Tapia donde se ha registrado la presencia de *M. pallidipennis* factor de riesgo para la salud de la población humana local. Todas las muestras fueron georeferenciadas (Anexo 1).



Figura 7. Larvas de *Galleria mellonella*

Las treinta muestras de suelo se colocaron individualmente en cajas de Petri con 5mm de espesor aproximadamente, con tres repeticiones para cada muestra, en total noventa preparaciones. En cada caja se colocó una larva de *G. mellonella* de la colonia mencionada anteriormente (Anexo 2). Los insectos se dejaron en estas condiciones por 10 días, con revisiones diarias para observar la presencia de micosis. Cuando apareció la esporulación del hongo sobre el insecto (Anexo 3), el micelio se sembró en cajas de Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) a 30 °C en incubadora (Goettel e Inglis, 1997).

Posteriormente se procedió a la purificación y aislamiento de los hongos presentes en las cajas de Petri realizado a partir de resiembras individuales en cajas de Petri con medio PDA. Se observaron las características morfológicas macro y microscópicas a las colonias aisladas procediendo luego a la preparación de microcultivos y cultivos monospóricos, al final se obtuvieron cuatro aislados.

8.13 Preparación del inóculo

Se tomaron las cuatro cepas de los hongos en estudio para la cual se desconocía su patogenicidad, y las dos cepas de control, se resembraron en medio sólido para obtener una dilución concentrada de conidias procediendo a sembrar cada una en siete cajas de Petri de 20cm de diámetro, de vidrio y con medio de cultivo PDA. Cuando la esporulación cubrió estas cajas, se lavaron con agua destilada estéril y se decantaron en tubos Eppendorf, para centrifugar a 5000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante de cada una de las cepas se desechó y la solución restante se concentró en un tubo de ensayo, obteniendo así la solución madre (Goettel e Inglis, 1997).

Se determinó la concentración de esporas de esta solución utilizando una cámara de Neubauer o hemocitómetro. Una vez conocida la concentración de la solución madre se preparó una solución cuya concentración fue de 1×10^8 conidias por mililitro. A partir de ésta se prepararon seis diluciones, obteniéndose así siete diluciones para su aplicación al estadio ninfal tres (N3) de *Meccus pallidipennis*.

8.14 Inoculación de *Meccus pallidipennis* con *Beauveria bassiana*

Cada dilución se aplicó con un aspersor de 30ml a círculos de papel filtro del tamaño del fondo de los envases que contenían a los insectos. Cada papel filtro se asperjó dos veces, dejando secar entre cada aplicación. Una vez realizada la impregnación con la dilución correspondiente se colocaron 10 individuos del estadio ninfal tres de *M. pallidipennis* en cada envase con perforaciones pequeñas en la tapa para asegurar la ventilación, y por último estos se pusieron en el fondo de envases cilíndricos negros de 10cm de diámetro.

El grupo control estuvo conformado por cinco envases a los que se les aplicó el mismo tratamiento, excepto que se asperjaron únicamente con agua destilada estéril. El grupo experimental y el grupo control se colocaron en diferentes incubadoras cada una a 28°C. Se observaron cada 12 horas durante 96 horas, registrando la mortalidad cada 24 horas.

8.15 Identificación fenotípica

Para preparar los micro cultivos se tomaron cajas de Petri con papel filtro humedecido con agua destilada estéril en el fondo, sobre el cual se colocó un pedazo de abatelenguas de madera estéril, y sobre éste un portaobjetos con un cuadro de medio de cultivo PDA (1cm²), sobre este se sembró el hongo, se cubrió con otro cuadro de medio de cultivo PDA de la misma dimensión, al final se colocó un cubreobjetos. Estos micro cultivos también fueron mantenidos a 30°C en la misma incubadora.

Los aislados de *Beauveria bassiana* obtenidos se resembraban periódicamente para mantener la viabilidad de las cepas para ser usadas en los bioensayos.

8.16 Caracterización genotípica

En la extracción de ADN se utilizó el protocolo de extracción AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep. Este kit está diseñado para purificar ADN genómico de una amplia variedad de muestras biológicas. Este sistema emplea un buffer C-L de

lisis y Proteinasa K para liberar eficientemente el ADN genómico. La contaminación generada por proteínas, pigmentos, carbohidratos y lípidos son separados del ADN genómico de manera eficiente mediante precipitación con el buffer P-D, acoplado con la adsorción selectiva del ADN genómico para una columna especial del AxyPrep. Después del lavado y de retirar las sales, el ADN purificado luego fue eluído en un buffer Tris.

Previo al experimento se realizaron las siguientes preparaciones:

- 1.Reconstitución del buffer W2. Antes de usar el kit, se añadió la cantidad de etanol especificada en la etiqueta del buffer y se mezcló. 56ml en este caso.
- 2.Se ajustó el baño de agua a 56°C.
- 3.Se constató la existencia de los buffer C-L y P-D para la precipitación antes de cada uso.
- 4.Se calentó el eluente a 65°C para mejor la eficiencia de la elución.
- 5.Se resuspendió la Proteinasa K en el buffer PK.

El procedimiento requiere de un colector aspirador AxyVac u otro colector que permita acomodar las columnas Miniprep.

8.16.1 Procedimiento

Se empleó micelio de hongo liofilizado y micelio fresco comprimido con papel filtro para eliminar el exceso de medio (Anexo 4). Para la homogenización y lisado se empleó el equipo TissueLyser II de Quiagen®. Posteriormente, se desarrollaron los siguientes pasos:

1. Se colocó un volumen de micelio del hongo igual al volumen de la perla de tungsteno y se adicionó 550 μ L de buffer PBS y 150 μ L de buffer C-L en un tubo de 2 mL de microcentrífuga (modificación implementada por el LBM del CNRCB).
2. Homogenización a una frecuencia de 30 Hz durante 5 minutos en el TissueLyser II.
3. Adición de 20 μ L de Proteinasa K y agitar en vórtex por 1 minuto cada muestra (modificación implementada por el LBM del CNRCB). Luego se incubó por 15 minutos a 56°C.
4. Adición de 350 μ L de buffer P-D y agitación en vórtex a máxima velocidad durante 30 segundos.
5. Centrifugación a 13,300 rpm durante 10 minutos.
6. Se colocó la columna Miniprep en un tubo de 2 mL y se transfirió el sobrenadante del paso anterior a la columna.

7. Centrifugación a 13,300 rpm durante 3 minutos. Se cambió la columna a un tubo nuevo de 2 mL.
8. Adición de 500 μL de buffer W1 con posterior centrifugación por 1 minuto a 13,300 rpm desechando el filtrado.
9. Adición de 700 μL de buffer W2. Centrifugación por 1 minuto a 13,300 rpm y se desechó el filtrado (con repetición).
10. Se regresó la columna al tubo y se centrifugó durante 1 minuto a 13,300 rpm para secar la columna eliminando los residuos solución.
11. Se transfirió la columna al tubo colector de 1.5 mL, después elución con 75 μL de buffer eluyente (precalentado) en el centro de la columna, con incubación a temperatura ambiente por 5 minutos y posterior centrifugación a 13,300 rpm por 1 minuto (con repetición).
12. Finalmente, se retiró la columna y se almacenó el ADN a 4°C.

8.16.2 Determinación de la concentración de ADN

La concentración de ADN que se obtuvo de cada uno de los cuatro aislados se determinó mediante espectrofotometría a 260/280 nm, para lo cual se realizó una dilución 1:500. La lectura se hizo contra un blanco de agua destilada estéril. La concentración de ADN se determinó aplicando la fórmula:

$$\mu\text{g de ADN}/\mu\text{L} = (\text{Lectura a 260 nm} \times 50 \times \text{dilución}) / 1000$$

Como resultado la determinación de la concentración de ADN, se determinó cuáles de las muestras de cada cepa eran las óptimas para la amplificación por PCR.

8.16.3 Visualización del ADN en gel de agarosa

Se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 0.5% para determinar la calidad del ADN. Para tal fin se mezclaron 5 μL de ADN con 1.6 μL del buffer de carga TBE y agua destilada estéril necesaria para un volumen final de 10 μL . Las mezclas fueron colocadas en los pozos del gel de agarosa fijado con bromuro de etidio en una concentración de 0.5 $\mu\text{L}/\text{ml}$. El corrimiento electroforético contó con 80 volts durante una hora y media. Posteriormente, se usó el transiluminador de luz ultravioleta para visualizar el ADN.

8.16.4 Amplificación de la región espaciadora de transcripción interna - ITS

El ADN total se sometió a PCR utilizando los oligonucleótidos que se mencionan a continuación:

Gen	Cebador	Secuencias (5' a 3')	Tm (°C)	Tamaño del producto	Referencia
ITS	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	66	600pb	Rehner y Buckley, 2005
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			

Tabla 1. Primers empleados para la secuenciación de la región ITS de las cepas Bb1, CNRCB, MucA y AFAO IX-5.

Los amplificadores de las regiones ITS se obtuvieron usando el kit Biorad para lo cual se emplearon los reactivos que se describen en la tabla 2, usando un termociclador C1000 Touch™ de BIORAD.

Reactivos (Marca BioTechMol)	Cantidad
Buffer 10X	1X (5 μ L)
MgCl ₂	2mM (2 μ L)
Taq polimerasa	1U (0.2 μ L)
dNTP mix 10 mM (Promega)	0.2mM (0.5 μ L)

Tabla 2. Reactivos y sus cantidades usadas en la amplificación de la región ITS de las cepas Bb1, CNRCB, MucA y AFAO IX-5.

La reacción de PCR implicó los siguientes pasos:

- 1.Desnaturalización inicial durante 4 minutos a 94°C
- 2.30 ciclos, cada uno con tres fases:
 - Desnaturalización: 1 minuto a 94°C
 - Alineamiento: 1 minuto a 55°C
 - Elongación: 2 minutos a 72°C
- 3.Extensión final 5 minutos a 72°C

8.16.5 Purificación y secuenciación de los productos

Los amplificadores de la región ITS se purificaron con el Gel/PCR DNA Fragments extraction kit. La secuenciación de los amplificadores purificados fue realizada en el Instituto de Biotecnología - IBT, de la Universidad Nacional Autónoma de México, en Cuernavaca - México (www.ibt.unam.mx/sintesis).

8.16.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico implicó transformar los datos originales obteniendo de ellos el arcoseno (sen^{-1}) mediante la prueba de Kruskal - Wallis para el contraste de k medianas, que es una ampliación de la prueba de Mann - Whitney - Wilcoxon para dos medianas que posibilita la comparación entre tres o más grupos. Esta es una prueba no paramétrica para probar si un grupo de datos proviene de la misma población.

9. RESULTADOS

9.1 Aislamiento de cepas

De las 90 muestras de suelo obtenidas, se procesaron treinta muestras de suelo de la localidad de San Juan de los Ríos, en el laboratorio de Parasitología y Vectores de la Escuela de Biología, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, cada muestra se dispuso por triplicado en cajas de Petri. Inicialmente se consideraron cinco cepas presuntivas de *Beauveria bassiana* por las características morfológicas macroscópicas coincidentes con esta especie entomopatógena. Sin embargo, el análisis microscópico de la morfología permitió descartar tres de los aislados al no coincidir con *B. bassiana*.

9.2 Identificación fenotípica

Posteriormente, se llevó a cabo la identificación fenotípica basada en aspectos morfológicos macroscópicos en cultivo y morfológicos microscópicos de cada cepa.

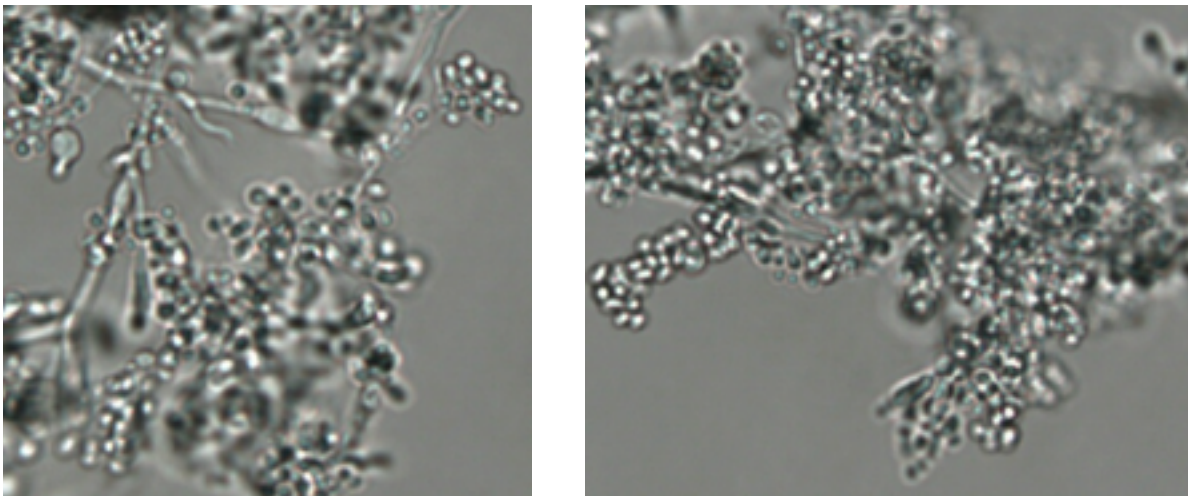


Figura 8. Identificación fenotípica microscópica de las cepas de *B. bassiana* aisladas de suelos de San Juan de los Ríos, Municipio de Chiantla de Tapia, Estado de Puebla.

Los dos aislados de *B. bassiana* mostraron rasgos característicos de la especie presentando un crecimiento circular, alcanzando 20 mm de diámetro en 10 días, coincidiendo con lo establecido por Domsch *et al*, (1993) para la colonia de *B. bassiana* en un rango de 0.6 a 2.3 cm de diámetro. El aspecto de la colonia es

lanoso y con apariencia polvosa debido a la abundante producción de conidios, de color blanco y luego amarillenta en la parte central del cultivo, de consistencia blanda y superficie plana (Fig. 9).

Esta especie posee hifas cenocíticas, lisas, con células conidiógenas formando densos racimos irregularmente agrupados, las fiálides se encuentran hinchadas en la base que asemeja la estructura de un frasco sub-globoso y se adelgazan hacia la parte que sostiene las esporas llamado raquis. El tamaño aproximado de las células conidiógenas es de 3.8 - 7 x 1.3 - 1.8µm, el raquis de 2.2 - 4.2 x 1µm. Los conidios de *B. bassiana* son hialinos, lisos, de forma globosa a elipsoidal con un tamaño de 2.2 - 3µm de diámetro, estos resultados coincidieron con la descripción hecha por Domsch *et al.* (1993) y Alean (2003), para la especie *B. bassiana*.

Las comparaciones se realizaron a partir de las secuencias espaciadoras de transcripción interna (ITS por su sigla en inglés) en la base de datos genómica BLAST la cual arrojó una similitud superior al 98% en las secuencias de ITS para cada una de las cuatro cepas de *Beauveria bassiana*, dos aisladas de las muestras de suelo y las dos de referencia.

FILE	DESCRIPTION	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident
2252.1AITS.ITS5ab1.ab1 (Bb1)22	Beauveria bassiana isolate SASR	1018	1018	98%	0	99%
2253.1AITS.ITS4ab1.ab1 (Bb1)22	Beauveria bassiana isolate SASR	1016	1016	98%	0	99%
2254.2AITS.ITS5ab1.ab1 (CNRCB)	Beauveria bassiana strain MRCIF	1018	1018	98%	0	99%
2255.2AITS.ITS4ab1.ab1 (CNRCB)	Beauveria bassiana strain CYT5	1016	1016	98%	0	99%
2256.3AITS.ITS5ab1.ab1 (MucA)2	Beauveria bassiana isolate SASR	1018	1018	98%	0	99%
2257.3AITS.ITS4ab1.ab1 (MucA)2	Beauveria bassiana isolate SASR	1014	1014	98%	0	99%
2258.4AITS.ITS5ab1.ab1 (IX-5)22	Beauveria bassiana strain PAL-B	1014	1014	98%	0	99%
2259.4AITS.ITS4ab1.ab1 (IX-5)22	Beauveria bassiana isolate SASR	1016	1016	98%	0	99%

Tabla 3. Comparación de las secuencias de las cepas Bb1, CNRCB, MucA y AFAO IX-5 en el Programa BLAST 2.0 QBLAST del National Center for Biotechnology Information.

Una vez cultivadas las cepas siguieron presentando características propias de la especie como se muestra a continuación:



Figura 9. Cultivos de las dos cepas de *B. bassiana* aisladas de suelos de San Juan de los Ríos, Municipio de Chiautla de Tapia, Estado de Puebla.

La imagen que se muestra al lado, corresponde a un corrimiento electroforético de la región génica ITS realizada después de la Reacción en Cadena de la Polimerasa - PCR, en donde se aprecia la amplificación del fragmento de interés a 600pb como lo cita Rehner y Buckley, 2005. El marcador molecular es de la marca Axyprep.

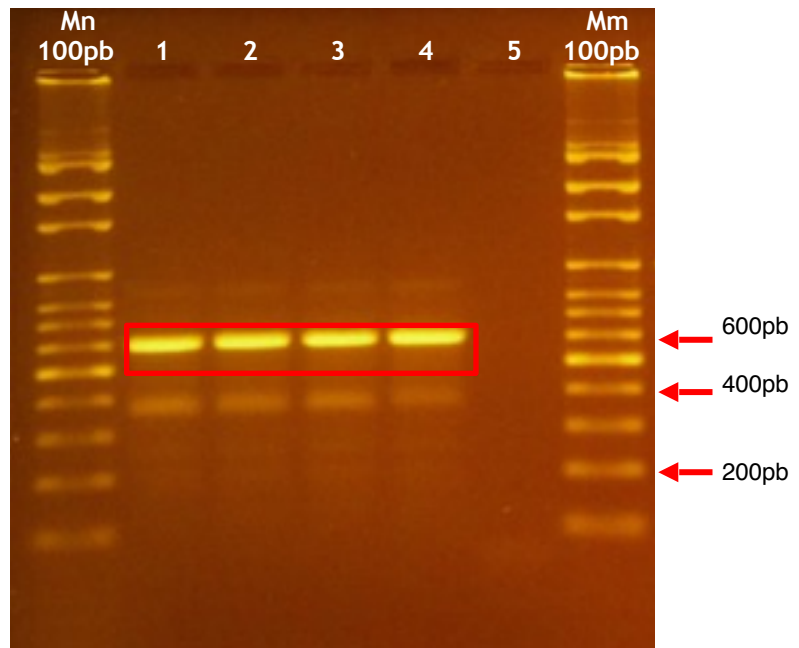


Figura 10. Corrimiento electroforético de las cepas después de la amplificación. Cada carril corresponde a: **1** Cepa Bb1, **2** Cepa CNRCB, **3** Cepa MucA, **4** Cepa IX-5 y **5** control.

9.3 Análisis de las secuencias obtenidas

Una vez recibida la secuenciación por parte del IBT/UNAM, se visualizaron a través del programa Chromas 2.01 y el análisis comparativo de las secuencias se llevó a cabo con el programa BLAST 2.0 QBLAST del National Center for Biotechnology Information Site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Los alineamientos se realizaron con el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Se generó un árbol filogenético mediante el método Neighbour-joining (Saitou and Nei, 1987). (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Sinauer Associates, Inc. Publishers) software (Swofford, 2002), con un análisis de confianza bootstrap de 100 réplicas (Felsenstein, 1985).

Árbol filogenético de secuencias ITS

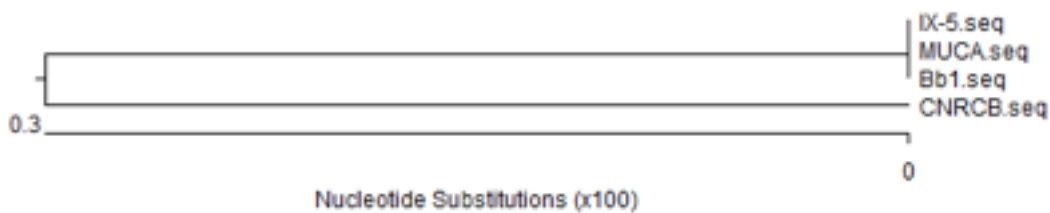


Figura 11. Árbol filogenético que muestra la convergencia genética de las 4 cepas en sus secuencias espaciadoras internas - ITS.

Distancias entre secuencias ITS

PORCENTAJE DE IDENTIDAD							
D I V E R G E N C I A		1	2	3	4		CEPAS
	1		99.4	100.0	99.8	1	Bb1.seq
	2	0.6		99.4	99.2	2	CNRC.seq
	3	0.0	0.6		99.8	3	IX-5.seq
	4	0.0	0.6	0.0		4	MucA.seq
		1	2	3	4		

Tabla 4. Distancias génicas entre las secuencias ITS de las cepas Bb1, CNRCB, AFAO IX-5 y MucA.

9.4 Mortalidad de Triatominos por cepa a diferente dilución cada 24 horas

24 horas					48 horas				
Dilución	CNRCB	Bb1	AFAO	MucA	CNRCB	Bb1	AFAO	MucA	
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	
1x10 ²	0	3	0	0	0	3	0	0	
1x10 ³	0	0	0	0	0	3	0	0	
1x10 ⁴	0	0	0	0	3	10	3	0	
1x10 ⁵	0	3	0	0	0	0	0	0	
1x10 ⁶	3	0	0	0	10	7	3	0	
1x10 ⁷	23	10	3	3	37	27	17	3	
1x10 ⁸	20	7	0	0	60	20	3	7	

Tabla 5. Mortalidad acumulada de las tres repeticiones por cada cepa a las 24 y 48 horas

72 horas					96 horas				
Dilución	CNRCB	Bb1	AFAO	MucA	CNRCB	Bb1	AFAO	MucA	
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	
1x10 ²	0	0	0	0	0	0	0	0	
1x10 ³	0	0	0	0	3	0	0	0	
1x10 ⁴	0	0	0	0	10	13	7	10	
1x10 ⁵	0	10	0	0	10	7	10	7	
1x10 ⁶	40	40	23	23	60	50	43	60	
1x10 ⁷	50	40	50	37	70	57	53	63	
1x10 ⁸	70	33	50	40	77	63	60	67	

Tabla 6. Mortalidad acumulada de las tres repeticiones por cada cepa a las 72 y 96 horas

9.5 Procesamiento de datos

Cepa CNRCB a las 96 horas

Número de muertos				Porcentaje de mortalidad		
CNRCB	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Control	0	0	0	0	0	0
1x10²	0	0	0	0	0	0
1x10³	1	0	0	10	0	0
1x10⁴	1	1	1	10	10	10
1x10⁵	1	1	1	10	10	10
1x10⁶	6	5	7	60	50	70
1x10⁷	6	7	8	60	70	80
1x10⁸	8	7	8	80	70	80

Tabla 7. Número de muertos y porcentaje de mortalidad de cada repetición a las 96 horas

Transformación arcsen

CNRCB	R1			R2			R3		
	R1/100	Raiz	Seno	R2/100	Raiz	Seno	R3/100	Raiz	Seno
Control	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
1x10²	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
1x10³	0.1	0.32	5.74	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
1x10⁴	0.1	0.32	5.74	0.1	0.32	5.74	0.1	0.32	5.74
1x10⁵	0.1	0.32	5.74	0.1	0.32	5.74	0.1	0.32	5.74
1x10⁶	0.6	0.77	36.87	0.5	0.71	30.00	0.7	0.84	44.43
1x10⁷	0.6	0.77	36.87	0.7	0.84	44.43	0.8	0.89	53.13
1x10⁸	0.8	0.89	53.13	0.7	0.84	44.43	0.8	0.89	53.13

Tabla 8. Transformación arcsen de los porcentajes de mortalidad de cada repetición

Datos transformados

CNRCB	R1	R2	R3
Control	0.00	0.00	0.00
1x10²	0.00	0.00	0.00
1x10³	5.74	0.00	0.00
1x10⁴	5.74	5.74	5.74
1x10⁵	5.74	5.74	5.74
1x10⁶	36.87	30.00	44.43
1x10⁷	36.87	44.43	53.13
1x10⁸	53.13	44.43	53.13

Tabla 9. Datos transformados y compilados por repetición de la transformación arcsen

Cepa Bb1 a las 96 horas

Número de muertos				Porcentaje de mortalidad		
Bb1	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Control	0	0	0	0	0	0
1x10²	0	0	0	0	0	0
1x10³	0	0	0	0	0	0
1x10⁴	1	2	1	10	20	10
1x10⁵	0	1	1	0	10	10
1x10⁶	6	4	5	60	40	50
1x10⁷	6	6	5	60	60	50
1x10⁸	7	6	6	70	60	60

Tabla 10. Número de muertos y porcentaje de mortalidad de cada repetición a las 96 horas

Transformación arcsen

Bb1	R1			R2			R3		
	R1/100	Raiz	Seno	R2/100	Raiz	Seno	R3/100	Raiz	Seno
Control	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
1x10 ²	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
1x10 ³	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00
1x10 ⁴	0.1	0.32	5.74	0.2	0.45	11.54	0.1	0.32	5.74
1x10 ⁵	0	0.00	0.00	0.1	0.32	5.74	0.1	0.32	5.74
1x10 ⁶	0.6	0.77	36.87	0.4	0.63	23.58	0.5	0.71	30.00
1x10 ⁷	0.6	0.77	36.87	0.6	0.77	36.87	0.5	0.71	30.00
1x10 ⁸	0.7	0.84	44.43	0.6	0.77	36.87	0.6	0.77	36.87

Tabla 11. Transformación arcsen de los porcentajes de mortalidad de cada repetición

Datos transformados

Bb1	R1	R2	R3
Control	0.00	0.00	0.00
1x10²	0.00	0.00	0.00
1x10³	0.00	0.00	0.00
1x10⁴	5.74	11.54	5.74
1x10⁵	0.00	5.74	5.74
1x10⁶	36.87	23.58	30.00
1x10⁷	36.87	36.87	30.00
1x10⁸	44.43	36.87	36.87

Tabla 12. Datos transformados y compilados por repetición de la transformación arcsen

Cepa AFAO IX-5 a las 96 horas

Número de muertos				Porcentaje de mortalidad		
AFAO	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Control	0	0	0	0	0	0
1x10 ²	0	0	0	0	0	0
1x10 ³	0	0	0	0	0	0
1x10 ⁴	0	1	1	0	10	10
1x10 ⁵	1	1	1	10	10	10
1x10 ⁶	4	3	6	40	30	60
1x10 ⁷	5	5	6	50	50	60
1x10 ⁸	5	5	8	50	50	80

Tabla 13. Número de muertos y porcentaje de mortalidad de cada repetición a las 96 horas

Transformación arcsen

AFAO	R1			R2/100	R2			R3/100	R3		
	R1/100	Raiz	Seno		Raiz	Seno	Raiz		Seno		
Control	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00		
1x10 ²	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00		
1x10 ³	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00		
1x10 ⁴	0	0.00	0.00	0.1	0.32	5.74	0.1	0.32	5.74		
1x10 ⁵	0.1	0.32	5.74	0.1	0.32	5.74	0.1	0.32	5.74		
1x10 ⁶	0.4	0.63	23.58	0.3	0.55	17.46	0.6	0.77	36.87		
1x10 ⁷	0.5	0.71	30.00	0.5	0.71	30.00	0.6	0.77	36.87		
1x10 ⁸	0.5	0.71	30.00	0.5	0.71	30.00	0.8	0.89	53.13		

Tabla 14. Transformación arcsen de los porcentajes de mortalidad de cada repetición

Datos transformados

AFAO	R1	R2	R3
Control	0.00	0.00	0.00
1x10²	0.00	0.00	0.00
1x10³	0.00	0.00	0.00
1x10⁴	0.00	5.74	5.74
1x10⁵	5.74	5.74	5.74
1x10⁶	23.6	17.5	36.9
1x10⁷	30	30	36.9
1x10⁸	30	30	53.1

Tabla 15. Datos transformados y compilados por repetición de la transformación arcsen

Cepa MucA a las 96 horas

Número de muertos				Porcentaje de mortalidad		
MucA	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Control	0	0	0	0	0	0
1x10²	1	0	0	10	0	0
1x10³	0	0	0	0	0	0
1x10⁴	1	1	1	10	10	10
1x10⁵	1	1	0	10	10	0
1x10⁶	5	7	6	50	70	60
1x10⁷	5	7	7	50	70	70
1x10⁸	7	7	6	70	70	60

Tabla 16. Número de muertos y porcentaje de mortalidad de cada repetición a las 96 horas

Transformación arcsen

MucA	R1			R2/100	R2			R3/100	R3		
	R1/100	Raiz	Seno		Raiz	Seno	Raiz		Seno		
Control	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00		
1x10 ²	0.1	0.32	5.74	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00		
1x10 ³	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0	0.00	0.00		
1x10 ⁴	0.1	0.32	5.74	0.1	0.32	5.74	0.1	0.32	5.74		
1x10 ⁵	0.1	0.32	5.74	0.1	0.32	5.74	0	0.00	0.00		
1x10 ⁶	0.5	0.71	30.00	0.7	0.84	44.43	0.6	0.77	36.87		
1x10 ⁷	0.5	0.71	30.00	0.7	0.84	44.43	0.7	0.84	44.43		
1x10 ⁸	0.7	0.84	44.43	0.7	0.84	44.43	0.6	0.77	36.87		

Tabla 17. Transformación arcsen de los porcentajes de mortalidad de cada repetición

Datos transformados

MucA	R1	R2	R3
Control	0.00	0.00	0.00
1x10 ²	5.74	0.00	0.00
1x10 ³	0.00	0.00	0.00
1x10 ⁴	5.74	5.74	5.74
1x10 ⁵	5.74	5.74	0.00
1x10 ⁶	30	44.4	36.9
1x10 ⁷	30	44.4	44.4
1x10 ⁸	44.4	44.4	36.9

Tabla 18. Datos transformados y compilados por repetición de la transformación arcsen

9.6 Comportamiento entomopatígeno de las cuatro cepas de *B. bassiana* sobre *Meccus pallidipennis* de tercer estadio

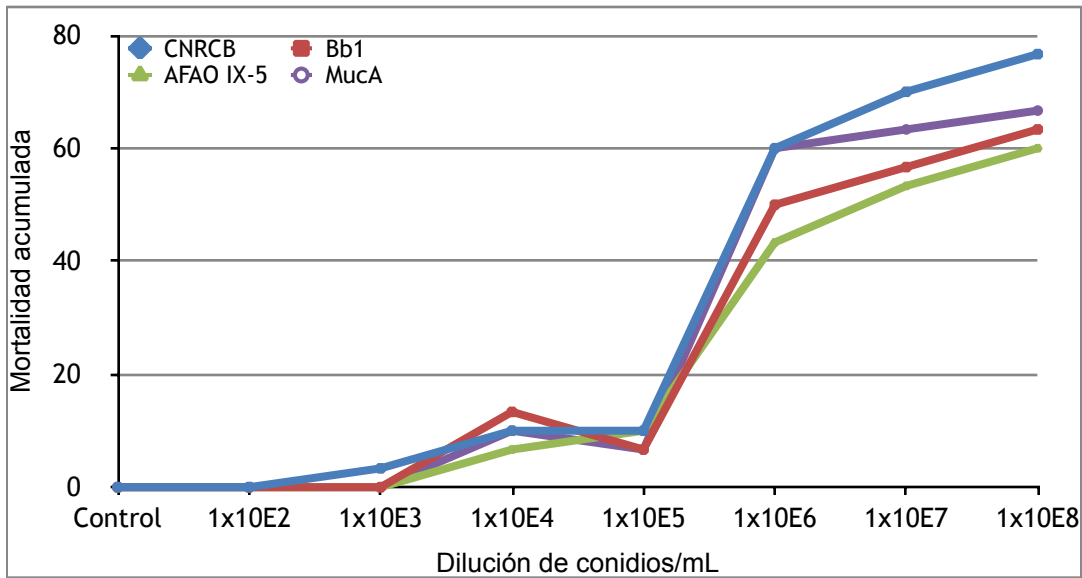


Figura 12. Comportamiento de las cuatro cepas de *Beauveria bassiana* a partir de las tres repeticiones durante las 96 horas de bioensayo sobre *Meccus pallidipennis*.

Cepa CNRCB

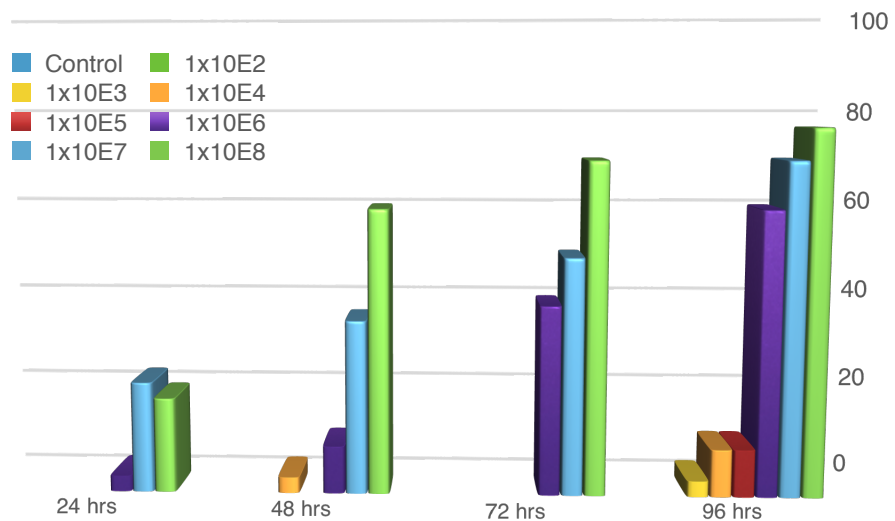


Figura 13. Mortalidad de *Meccus pallidipennis* a cargo de cada dilución de *Beauveria bassiana* cepa CNRCB a las 24, 48, 72 y 96 horas

Cepa Bb1

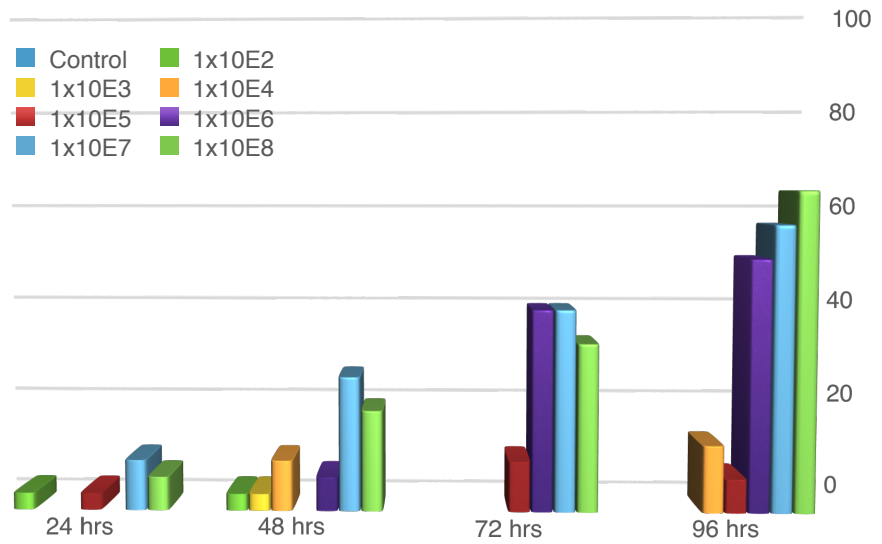


Figura 14. Mortalidad de *Meccus pallidipennis* a cargo de cada dilución de *Beauveria bassiana* cepa Bb1 a las 24, 48, 72 y 96 horas

Cepa AFAO IX-5

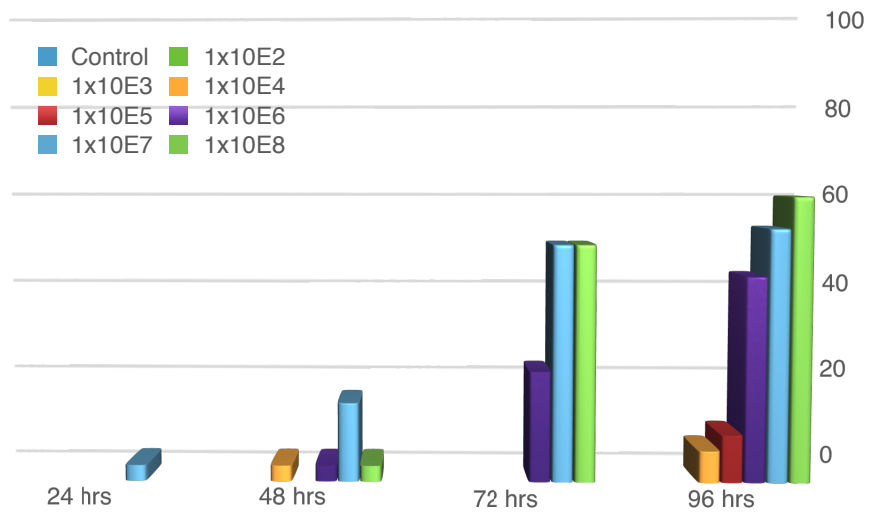


Figura 15. Mortalidad de *Meccus pallidipennis* a cargo de cada dilución de *Beauveria bassiana* cepa AFAO IX-5 a las 24, 48, 72 y 96 horas

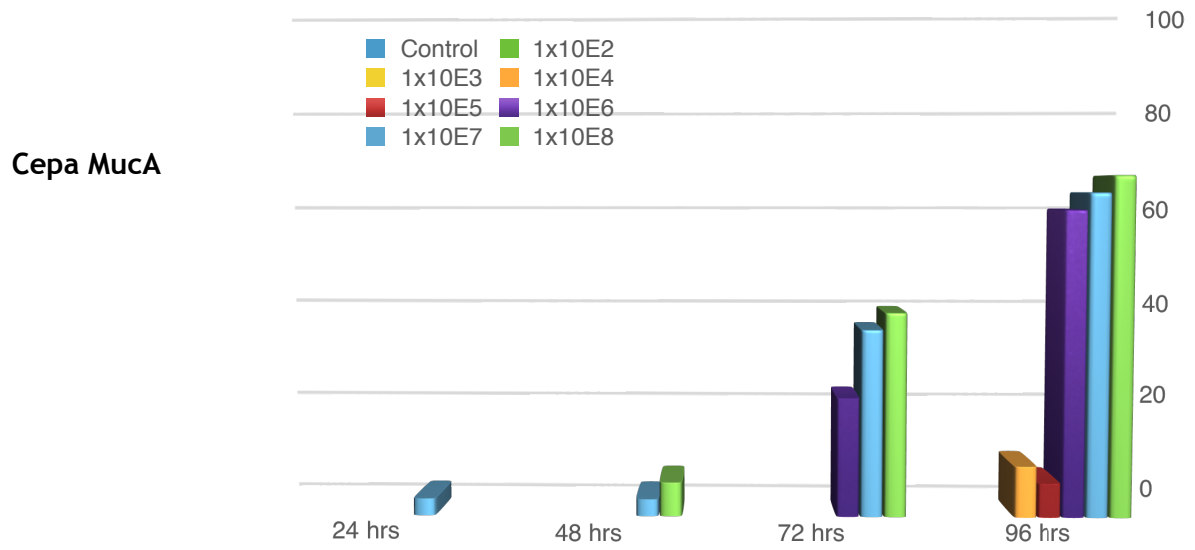


Figura 16. Mortalidad de *Meccus pallidipennis* a cargo de cada dilución de *Beauveria bassiana* cepa MucA a las 24, 48, 72 y 96 horas

10. DISCUSION

En la figura 12 se muestra la mortalidad acumulada de cada cepa en las tres repeticiones a lo largo de las 96 horas del bioensayo. El comportamiento de las cuatro cepas es semejante con una mortalidad inferior al 5% cuando se empleó hasta 1×10^3 conidios/mL. A partir de esta concentración y hasta 1×10^5 se presentó un leve aumento en la mortalidad de las ninfas de tercer estadio pero aun así no alcanzó el 20% y las concentraciones mayores a 1×10^5 y hasta 1×10^8 generaron del 40 al 80% de la mortalidad total. Las tres fases que se aprecian en esta gráfica reflejan que a mayor concentración y tiempo de exposición mayor fue la mortalidad de las ninfas por cada cepa en las tres repeticiones.

Siguiendo con el análisis de la figura 12, se aprecia cómo el comportamiento de las cuatro cepas es tendiente a continuar aumentando la mortalidad de los triatominos hecho que se reafirma con los trabajos de Romaña y Fargues 1987, Luz *et al.* 1998, Luz y Fargues 1999, Fargues y Luz 2000 y Lecuona *et al* 2001, quienes entre otros investigadores destacan la gran actividad entomopatógica de *B. bassiana* contra Triatominos, señalando algunos de ellos entre 5 y 12 días el tiempo en el que se alcanza la mayor mortalidad de triatominos expuestos a conidios de *B. bassiana* bajo condiciones de laboratorio.

También se aprecia en esta figura que la cepa CNRCB generó la mayor mortalidad al cabo de las 96 horas teniendo en cuenta las tres repeticiones, siendo los dos aislados del sur del Estado de Puebla quienes la secundaron con mortalidades entre el 60 y 70%.

La cepa CNRCB fue la única que participó con seis diluciones como causante de mortalidad a las 96 horas, lo que muestra ser un cepa con alta virulencia, como muestra de ello se aprecia como las mayores diluciones de esta cepa a las 24 y 48 horas ya eran causantes entre el 20 y 58% de los hemipteros, mientras que la cepa AFAO IX-5 fue la que menos mortalidad causó, sin embargo esta fue del 60%.

Las cuatro cepas, aunque con pequeñas diferencias fueron causantes de mortalidad antes de transcurrido la mitad del bioensayo, por lo que posteriores investigaciones deberán estar dirigidas a conocer el efecto de las diluciones bajas en los triatominos con el paso del tiempo.

Por otro lado, las condiciones de humedad relativa y temperatura de este estudio que fueron de 90% y 27°C respectivamente, desempeñaron un papel importante en la pronta colonización del insecto, por lo que este bioensayo contó con las condiciones óptimas que en este rubro citan diversos autores, quienes a su vez reportan que la humedad relativa y la temperatura son factores limitantes en el desarrollo del hongo sobre el insecto hospedero (Glare y Milner 1991, Ferron *et al.* 1991), al mismo tiempo que las tasas más altas de infección y muerte rápida de Triatominos a causa de *B. bassiana* se han obtenido con humedades relativas cercanas a la saturación (Luz, 1998), hecho corroborado por Silva y Messias 1985, Romaña y Fargues 1987, Luz 1990, Romaña 1992, Luz *et al.* 1994, disminuyendo la infección en los insectos cuando la humedad relativa es inferior al 97% (Luz, 1994).

Respecto a la temperatura como factor preponderante en la acción entomopatógena de *B. bassiana*, Ferron *et al.* 1991, señalan que la óptima para el desarrollo del hongo en su hospedero está en el rango de 16 a 30°C, con desarrollo más acelerado a mayores temperaturas, lo que hace intuir el potencial éxito de *B. bassiana* como hongo entomopatógeno controlador de Triatominos en el sur occidente del Estado de Puebla donde las temperaturas superan los 30°C durante seis a ocho meses en el año y con clima que va de seco semicálido, semiseco cálido, semiseco templado a semiseco muy cálido (INEGI, 2006).

11 CONCLUSIONES

- Se aislaron e identificaron dos cepas de *Beauveria bassiana* a partir de muestras de suelo de San Juan de los Ríos, Chiautla de Tapia, Estado de Puebla, zona con altos índices de colonización por triatominos.
- Los dos aislados de *Beauveria bassiana* colectados de suelos de la localidad de San Juan de los Ríos, Municipio de Chiautla de Tapia, sur occidente del Estado de Puebla, presentaron similitud tanto fenotípica como genotípica superior al 98%, entre sí y comparadas con las dos cepas de referencia, AFAO IX-5 y CNRCB.
- Se determinó la mortalidad de Triatominos de tercer estadio mediante bioensayo, exponiéndolos a diferentes diluciones de los aislados colectados para candidatizarlos como potenciales controladores de los vectores de la enfermedad de Chagas.
- Se evaluó en condiciones de laboratorio el efecto entomopatígeno de los dos aislados sobre Triatominos de tercer estadio vectores de la enfermedad de Chagas. Los dos aislados mostraron un efecto entomopatígeno sin diferencia estadísticamente significativa con las dos cepas de referencia.
- La dilución que generó la mortalidad más alta para cada una de las cepas fue la de 1×10^8 conidios/mL y se logró a las 96 horas de exposición.
- Los aislados de *B. bassiana* tienen un potencial entomopatígeno alto que les permitiría ser consideradas en programas de control biológico en áreas con presencia de Triatominos en el sur del Estado de Puebla y otras zonas con características ambientales similares.

12 PERSPECTIVAS

Posteriores trabajos deberán estar encaminados a explicar las diferencias en la virulencia mostrada por los dos aislados y las dos cepas de referencia, para maximizar el uso de cada uno de ellas sobre las especies que sean blanco de control.

Investigar sobre los posibles efectos que podrían tener los conidios o el cuerpo micelial de *Beauveria bassiana* sobre los diferentes estadios de *Trypanosoma cruzi* en el interior del hemiptero.

Conocer el efecto de las diluciones bajas de *Beauveria bassiana* en la infertilidad de las hembras, morbilidad y vida media de *Meccus pallidipennis* en condiciones de laboratorio.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que los aislamientos de *B. bassiana* causaron mortalidad a Triatomíneos de tercer estadio ninfal sin diferencia estadísticamente significativa respecto a las dos cepas de referencia, AFAO IX-5 y CNRCB. No obstante, se requiere investigar en campo para determinar las mejores condiciones de aplicación y eventualmente establecer las formulaciones adecuadas para garantizar su efectividad en el biocontrol.

13. BIBLIOGRAFÍA

Alves, S.B. and Pereira, R.M. 1989. Production of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. in Plastic Trays. *Ecosistema* 14:188-192.

Borror D.J.; De Long D.M.; Triplehorn C.A. 1981. An Introduction to the study of insects. 5a Ed. Filadelfia Estados Unidos. 827 pp.

Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M (2001) Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol* 36: 337-346.

Carreño A.I. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* (homóptera: aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Pontificia Universidad Javeriana, facultad de Ciencias Básicas, Microbiología agrícola y veterinaria. Bogotá, Colombia, pp.116.

Charnley A. 1984. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review. In: *Invertebrate-microbial Interactions*. Anderson J.; Rayner A. and Walton, D. Cambridge University Press. Cambridge. pp 229-270.

Corredor A, Santacruz M, Páez S, Guatame L. 1990. Distribución de los triatominos domiciliarios y extradomiciliarios en Colombia. Bogotá: Instituto Nacional de Salud. p. 144.

Costero A, Edman J. D., Clark G. G., Scout T. W. 1998. Life table study of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Puerto Rico fed only human blood plus sugar. *J. Med. Entomol.* 35:809-813, en: Muñoz L. A., Jamboos T. J. C. 2007. Modelación matemática en dengue. pp. 10.

D. A. Leiby, E. J. Read, B. A. Lenos et al., "Seroepidemiology of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas' disease, in US blood donors," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 176, no. 4, pp. 1047-1052, 1997.

De Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Goncalves VF, et al. (2006) Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* 2: e24.

DEVELOUX M, Lescure F, Le loup G, Pialoux G. Chagas disease. *La revue de medecine interne.* 2009; 30: 686-695.

Duran, M. J. 2002. Bioplaguicidas Guía de Ingredientes Activos en América Central. Manual Técnico No. 49. CATIE. Turrialba, Costa Rica . 153 p.

Elósegui, O., Carr, A. 2003. Hongos entomopatógenos y antagonistas. Principales grupos. Características. Aislamiento, identificación y caracterización de hongos entomopatógenos y antagonistas. Métodos de conservación. En: Memorias del Curso Internacional "Producción y uso de Bioplaguicidas en Diferentes Agroecosistemas, INISAV, La Habana, Nov. 2003.

Enríquez E. y Chanquin S. 2003. Evaluación de la virulencia de diferentes cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control biológico de *Triatoma dimidiata*. FODECYT.

Flores, A. E., Badii M.H. y Ponce G.G. 2001. Resistencia a insecticidas en insectos vectores de enfermedades con énfasis en mosquitos. RESPYN 2(4).

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.

García M., Cappello S., Leshner J. y Molina R. 2011. Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Revista Horizonte Sanitario. Mayo - Agosto. Vol. 10, No 2. pp. 21-28.

Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, et al. 2003. Mechanisms of genetic exchange in American trypanosomes. Nature 421: 936-939.

Gillespie, A. 1988. Use of fungi to control pest of agricultural importance. In: Burge, M. (Ed) Fungi in biological control systems. Manchester University Press, Manchester, England. 269 pp.

Gobierno del Estado de Puebla, Secretaría de Gobernación. 1988. Los Municipios de Puebla, 1ª Edición.

Goettel M.S. 1987. Studies on bioassay of the entomopathogenic hyphomycete fungus *Tolyposcladium cylindrosporium* in mosquitoes. Journal of the American Mosquito Control Association. 3(4): 561-567.

Goettel M.S., Sigler Lynne y Carmichael J. W. 1984. Estudios sobre mosquito, con el hongo patógeno Hyphomycete *Culicinomyces clavisporus*. Micología 76 (4): 614-625.

Goettel M.S., Toohey M.K. 1983. Preliminary Infection Trials with a Fiji isolate of the Mosquito Pathogenic Fungus *Lagenidium*. Journal of Invertebrate Pathology. (41): 1-7.

Goettel, M.S. y Inglis D.G. 1997. Hyphomycetes, Chapter V-3, pp 213-249 in Manual of Techniques in Insect Pathology (L.A. Lacey, ed), Academic Press, London, 409 pp.

Guhl F., Jaramillo C., Yockten R., Vallejo G. y Cárdenas-Arroyo F. 1997. *Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies. Lancet, 349(9062):1370.

Hernández S.R. 2000. Evaluación del hongo *Beauveria bassiana* para el control del *Triatoma dimidiata*. Instituto Nacional de Aprendizaje. La Chinchilla, Cartago.

Humber R.A. Entomopathogenic Fungal Identification. 1998. Join Manual Meeting. E.U. pp. 26

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 1990. XI Censo General de Población y Vivienda.

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 1996. Anuario Estadístico del Estado de Puebla.

Krik M.L., Schofield C.J. 1987. Density-dependent timing of defecation by *Rhodnius prolixus*, and its implications for the transmission of *Trypanosoma cruzi*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 81:348-9.

Landa, Z. y Osborne, L. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. Florida Entomologist 75(1): 456-471

López L. C., Steciow M.M. y García J.J. 1999. Registro más austral del hongo *Leptolegnia chamanii* (Oomycetes: Saprolegniales) como patógeno de larvas de mosquitos (Diptera: Culicidae). Rev. Iberoam. Micol. 16: 143-145

López L.V.; Hans Börje J. 2001. Biodiversidad del suelo: control biológico de nemátodos fitopatógenos por hongos nematófagos. Cuaderno de Biodiversidad 6: 12 - 15

Magall, 2006. Riesgo de transmisión de la tripanosomiasis americana por triatominos en México. Rev Panam Salud Pública. 19(3):201-202

Magallón G. E. 2006. Epidemiological risk for *Trypanosoma cruzi* transmission by species of *Phyllosoma* complex in the occidental part of Mexico. Acta Trop. 97:33-108.

Mitelma J. 2007. Actualización en miocardiopatía chagásica. Chagas en Iberoamérica. Epidemiología, clínica, tratamiento e investigación.

Monath T. P. 1970. The arboviruses: Epidemiology and Ecology. Vol II. CRC Press, Inc. En: Muñoz L. A., Jamboos T. J. C. 2007. Modelación matemática en dengue. pp. 9.

Montenegro, V. Enfermedad de Chagas, 1999. Tesis de Grado Universidad Nacional Autónoma, Costa Rica.

Monzon, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. (63): 95-103.

Moreno J. 1995. Estudios epidemiológicos sobre la enfermedad de Chagas en algunas regiones de Colombia. En: Tópicos de infectología. Medellín: Universidad de Antioquia. p. 97-104.

Pell JK, Eilenberg J, Hajek AE, Steinkraus DC 2001. Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, pp 71-153.

Peteira B., González I., Arias Y., Fernández Turro A., Miranda I., Martínez B. 2011. Biochemical characterization of six isolates of *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN. Rev. Protección Veg. v.26 n.1 versión On-line ISSN [2224-4697](https://doi.org/10.2224/4697).

Pollard, E. y Yates, T.J. 1993. Monitoring butterflies for ecology and conservation. Chapman y Hall, London 256 pp.

Rassi A Jr, Rassi A, Marin Neto JA. 2010. Chagas' disease. Lancet;375:1388-402.

Salazar S. P., De Haro A. I. y Cabrera B. M. 2005. Tres especies de triatominos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México. MEDICINA. Buenos Aires 65: 63-69.

Samson, R.; Evans, H.; Latgé, J. 1988. "Atlas of Entomopathogenic Fungi". Springer-Verlag, Berlin. 300 p.

Schofield C. 1998. Control de la tripanosomiasis americana y leishmaniosis: aspectos biológicos, genéticos y moleculares. Guhl F., Jaramillo C. editores. Enfermedad de Chagas. Santa fe de Bogotá: Universidad de los Andes. p.1-4.

Schofield C. 1994. Triatominae: Biología y control. Eurocommunica. p.80.

Schofield C, Dujardin JP, Moreno J, Guhl F. 1997. Memorias Curso Posgrado Genética poblacional de vectores triatomineos aplicada al control vectorial de la enfermedad de Chagas, Santa Fe de Bogotá; 89.

Schofield C. 1986. A key for identifying faecal smears to detect domestic infestations of triatomine bugs. Rev Soc Brasileira Med Trop. 19: 5-8.

Secretaría de Salud. 1984. Manual para la vigilancia epidemiológica del dengue, en: Muñoz L. A., Jamboos T. J. C. 2007. Modelación matemática en dengue. pp. 9.

Sherlock I., Carcavallo R., Galindez I. 1998. List of natural and experimental flagellate infections in several triatomine species. In: Caravallo R.U., Galindez I., Jurberg J., Lent H. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p.393.

Stefanescu, C. 2000. The Butterfly Monitoring Scheme en Catalunya: Los primeros cinco años. Treballs de la Societat Catalana de Lepidopterologia, 15: 3-46.

Tanada, Y.; Kaya, H. 1993. Insect Pathology. Academic Press. San Diego, California. (USA). 666 p.

TEIXEIRA A, Nitz N. Guimaro M, Gomes C, *et al.* 2006. Chagas disease: a review. Postgrad Med J.; vol 82,788-98.

Torres A. A., Reyes V. Y., López L. E. y De la Torre M. 2002. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería Avance y Perspectiva vol. 21: 291-295.

Trumper E.V., Gorla D.E. 1991. Density-dependent timing of defecation by *Triatoma infestans*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 85:800-2.

Vidal A. V., Ibáñez B. S., Martínez C. C. 2004. Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. Salud Publica México 42:496-503.

Wier-López EH. 1982. Estado alimentario y regulación poblacional en *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). Tesis, Universidad Simón Bolívar, Venezuela; 285.

Wolff M., Arboleda J., González C., Manotas I., Rueda A. 1994. Estudio de tripanosomiasis americana, municipio de Amalfi, vereda Montebello. Bol. Epid Antioquia. XIX:302-5.

World Health Organization. 1982. Manual on environmental management for mosquito control, en: Muñoz L. A., Jamboos T. J. C. 2007. Modelación matemática en dengue. pp. 9.

Zeledón, R. 1981. El *Triatoma dimidiata* y su relación con la Enfermedad de Chagas. Editorial Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica 56-78.

Zeledón R. 1976. Effects of triatominae behavior on *Trypanosoma* transmisión. New approaches in American trypanosomiasis research. Scientific publications. Washington, D.C.: OPS. p.393.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, *et al.* 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraespecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 104: 1051-1054.

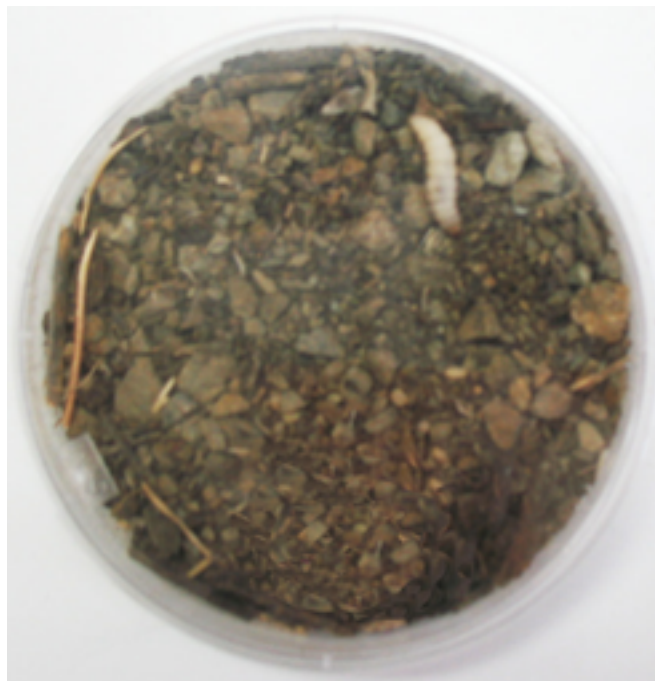
ANEXOS

Anexo 1

GEOREFERENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS EN EL ÁREA DE ESTUDIO								
Muestra	Coordenadas	msnm	Muestra	Coordenadas	msnm	Muestra	Coordenadas	msnm
1*	14553041E	824	11	14552861E	842	21	14552712E	857
	2011547N			2011570N			2011332N	
2	14552717E	806	12*	14552972E	838	22	14552790E	833
	2011035N			2011494N			2011317N	
3	14552665E	819	13	14553199E	831	23	14552843E	825
	2011119N			2011623N			2011279N	
4	14552589E	845	14	14552965E	817	24	14552944E	818
	2011187N			2011350N			2011239N	
5	14552540E	839	15*	14552924E	836	25	14555300E	807
	2011204N			2011414N			2011278N	
6	14552621E	845	16	14552845E	850	26*	14552916E	810
	2011319N			2011496N			2011154N	
7*	14552571E	857	17	14552844E	849	27	14552813E	847
	2011572N			2011498N			2011187N	
8	14552658E	890	18	14552844E	849	28	14552749E	827
	2011715N			2011498N			2011219N	
9	14552711E	879	19*	14552844E	849	29	14552660E	829
	2011623N			2011498N			2011255N	
10	14552765E	875	20	14552658E	859	30	14552711E	839
	2011625N			2011358N			2011270N	

* Muestras de suelo en donde no se observó crecimiento de hongo.

Anexo 2



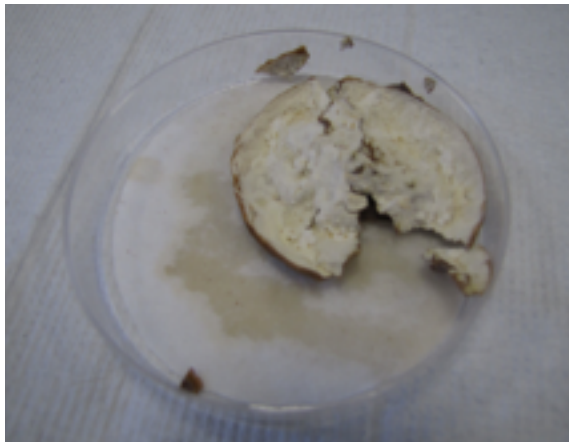
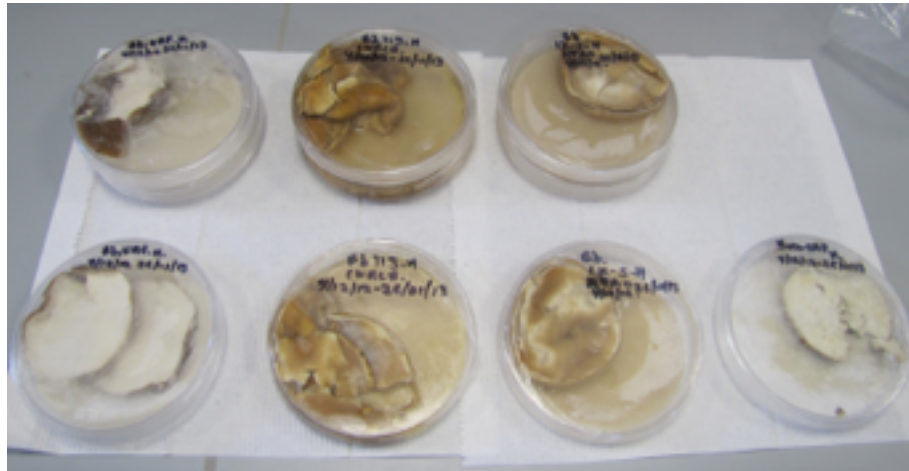
Larvas de *Galleria mellonella* en muestras de suelo recolectado en San Juan de los Ríos, Chiautla de Tapia, Sur del Estado de Puebla.

Anexo 3



Beauveria bassiana que emergió de las larvas de *Galleria mellonella* a partir de las cuales se aisló el hongo para su posterior cultivo.

Anexo 4



Deshidratación del micelio de las cuatro cepas de *Beauveria bassiana* que se realizó para seguir el protocolo de extracción de ADN.