






# Identificación molecular del hongo *Neurospora* spp. aislado de *Haematopinus tuberculatus* de búfalos (*Bubalus bubalis*)

## Molecular identification of the fungus *Neurospora* spp. isolated from *Haematopinus tuberculatus* from buffalo (*Bubalus bubalis*)

Nadia Florencia Ojeda-Robertos<sup>1</sup> , Liliana Aguilar-Marcelino<sup>2</sup> , Roger Iván Rodríguez-Vivas<sup>3</sup> , Ricardo Sánchez-Cruz<sup>4</sup> , Arnoldo Wong-Villarreal<sup>\*5</sup> 

<sup>1</sup>División Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Km 25 Carr. Villahermosa-Teapa Ra. La Huasteca, 2ª sección, CP. 86298. Centro, Tabasco, México.

<sup>2</sup>Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP. Km 11 Carr. Federal Cuernavaca-Cuautla, No. 8534, Col. Progreso, CP. 62550. Jiutepec, Morelos, México.

<sup>3</sup>Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Km 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil. CP. 97700. Mérida, Yucatán, México.

<sup>4</sup>Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Investigador Posdoctorante. Av. Universidad sn, Chamilpa, CP. 62210. Cuernavaca, Morelos, México.

<sup>5</sup>División Agroalimentaria, Universidad Tecnológica de la Selva, Carretera Ocosingo- Altamirano, CP. 29950. Ocosingo, Chiapas, México.

\*Autor de correspondencia: wova79@hotmail.com

### Nota científica

Recibida: 7 de febrero de 2024

Aceptada: 19 de junio de 2024

**RESUMEN.** Se reporta el aislamiento de dos cepas de hongos del piojo *Haematopinus tuberculatus* proveniente de búfalos de agua criados en el trópico de México. Los piojos con presencia de abundante micelio en su cuerpo, fueron incubados durante 12 h luz/obscuridad para favorecer el crecimiento micelial. Los hongos se transfirieron y aislaron en un medio agar de papa dextrosa (20%). De las dos cepas aisladas, se extrajo ADN genómico y se amplificaron los genes 28S rARN y secuencias ITS. El 76.1% de los piojos colectados presentaron crecimiento de micelio blanquecino en su cuerpo. Se determinó que hongo pertenece al género *Neurospora* spp. El presente estudio permitió el hallazgo del hongo saprófito del género *Neurospora* en el piojo *H. tuberculatus*, el cual fue confirmado mediante su morfología y secuenciación genética.

**Palabras clave:** Artrópodo, micelio, identificación, saprófito, toxonomía.

**ABSTRACT.** The isolation of two fungal strains of the louse *H. tuberculatus* from water buffaloes raised in the tropics of Mexico is reported. Lice with the presence of abundant mycelium on their body were incubated for 12 h light/dark to promote mycelial growth. Fungi were transferred and isolated on potato dextrose agar medium (20%). From the two isolated strains, genomic DNA was extracted and the 28S rRNA genes and ITS sequences were amplified. The 76.1% of the lice collected showed white mycelium growth on their body. It was determined that the fungus belongs to the genus *Neurospora* spp. The present study allowed the discovery of the saprophytic fungus of the genus *Neurospora* in the louse *H. tuberculatus*, which was confirmed through its morphology and genetic sequencing.

**Keywords:** Arthropod, mycelium, identification, saprophyte, taxonomy.

## INTRODUCCIÓN

El piojo *Haematophinus tuberculatus*, es una de las principales especies de ectoparásitos que afectan a los búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) (Ojeda-Robertos *et al.* 2022). Estos piojos pertenecen al suborden Anoplura y se caracterizan por tener piezas bucales adaptadas para succionar sangre, además son parásitos permanentes de los búfalos con un ciclo de vida simple que se completa entre 21 y 27 días (Egri 2019). Los piojos sólo pueden sobrevivir por cortos periodos de tiempo en el medio ambiente, por lo que su abundancia y presencia está íntimamente relacionada con la presencia del hospedador (Batista *et al.* 2018). Este género de piojo ocasiona problemas de salud en los rumiantes, entre los que se encuentran, lesiones en la piel, irritación, prurito, intranquilidad, baja de peso, disminución de ganancia de peso y producción de leche (Ojeda-Robertos *et al.* 2022). *H. tuberculatus* es un parásito hematófago por lo que su presencia está relacionada con anemia. Además, es vector de patógenos como bacterias, virus y protozoarios que son de interés en la salud animal y pública (Neglia *et al.* 2013, Veneziano *et al.* 2013). En México, recientemente, se ha notificado la presencia del piojo en hatos de búfalos criados en los estados de Veracruz y Tabasco (Hernández-Velazco *et al.* 2020, Ojeda-Robertos *et al.* 2022), y se ha sugerido como potencial vector de *Anaplasma marginale*, agente que afecta a los bovinos (Hernández-Velazco *et al.* 2020).

Por otro lado, los hongos entomopatógenos, son organismos que han sido utilizados como antagonistas naturales de biocontrol de artrópodos (Alonso-Díaz y Fernández-Salas 2021). Los hongos *Metarhizium anisopliae sensu lato* (s.l.) y *Beauveria bassiana* s.l. han sido utilizados con éxito como enemigos naturales para el control de artrópodos (Ojeda-Chi *et al.* 2011, Romo-Martínez 2013, Ebani y Mancianti 2021). En los trópicos húmedos el hongo filamentoso *Neurospora* spp. es comúnmente encontrado en estrecha asociación con humanos y animales, en lugares tales como fábricas de madera, panaderías, cultivos de maíz, caña de azúcar y arroz, así como en áreas con vegetación quemada. Asimismo, *Neurospora* spp. también ha sido aislado de insectos como *Lucilia cuprina* (Benjo *et al.* 2006).

Algunas especies del género *Neurospora* presentan actividad biológica mediante la producción de metabolitos que tienen el potencial de ser agentes biológicos anti-tumorales (contra el cancer invasivo de mama) (Jinu y Jayabaskaran 2015, Han *et al.* 2022), y también se ha notificado que pueden afectar el desarrollo embriogénico (Syed *et al.* 2008) y la oviposición de insectos (Lou *et al.* 2019). Debido al promisorio uso de los hongos para el control biológico de artrópodos, el presente estudio tiene como objetivo reportar la presencia e identificar taxonómica y molecularmente a los hongos aislados a partir del cuerpo de piojos *H. tuberculatus* obtenidos de búfalos de agua en el trópico mexicano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

El estudio se realizó en un rancho de producción bufalina localizado entre los estados de Tabasco y Chiapas, México (17° 54' 21" LN, 93° 06' 07" LO). El clima de la región se caracteriza por ser

tropical húmedo, con lluvias en verano, precipitación pluvial anual de 2 550 mm y una temperatura media anual de 27 °C (INEGI 2019). La zona se caracteriza por ser inundable por su cercanía con el río de la Sierra y con un sistema de lagunas que colidan con la unidad productiva.

### **Colecta de piojos en búfalos con infestación natural**

La colecta de piojos se realizó durante un brote que se presentó en un hato de búfalos de agua (*B. bubalis*). Se seleccionaron al azar 20 búfalas adultas infestadas naturalmente y que previamente no hubieran sido tratados con insecticidas. De los animales seleccionados se colectaron 130 piojos adultos (machos y hembras) y ninfas. El número de piojos incluidos en el estudio dependió del grado de infestación de las búfalas. Los piojos fueron depositados en placas de Petri para su conservación y traslado al laboratorio.

### **Identificación de presencia de micelio en los piojos**

Los piojos colectados se trasladaron al laboratorio con la finalidad de detectar la presencia de crecimiento miceliar en la cutícula de los parásitos, y de corroborar la identidad de los piojos. Los piojos se mantuvieron a temperatura ambiente (25 °C) y se inspeccionaron individualmente cada 4 h durante las primeras 24 h post-colecta. La inspección individual se realizó para detectar la presencia del micelio en el cuerpo de los parásitos para lo que se utilizó un estereoscopio (20X) (Carl Zeiss modelo StemiDV4®).

Después de las 24 h de observación, se seleccionaron 30 piojos positivos a la presencia de micelio. Los piojos con crecimiento micelial abundante fueron separados y transferidos a otra caja de Petri para ser enviados al laboratorio del CENID Salud Animal e Inocuidad del INIFAP, ubicado en Jiutepec, Morelos, México.

### **Identificación morfológica de los piojos**

Con el fin de confirmar la identificación taxonómica de acuerdo con un trabajo previamente publicado (Ojeda-Robertos *et al.*, 2022), se seleccionaron aleatoriamente 10 piojos. Los especímenes fueron transferidos a un vial con alcohol al 70% y posteriormente fueron aclarados con hidróxido de potasio y fijados en bálsamo de Canadá. La identificación se realizó con la ayuda de un microscopio compuesto (20X), y se utilizaron las claves taxonómicas descritas por Meleney y Kim (1974).

### **Crecimiento del hongo en el laboratorio**

Para favorecer el crecimiento de las estructuras fúngicas, los 30 especímenes con abundante crecimiento de micelio desde las primeras horas de la inspección, se colocaron de forma individual en placas de Petri (60 x 15 mm), que contenían agua-agar al 2% con el antibiótico cloranfenicol (Laboratorio Sigma®). Las placas de Petri se incubaron por siete días a temperatura ambiente (18-25°C) y fotoperiodo de 12 h luz/obscuridad (Barron 1977). Diariamente se observaron las placas de Petri bajo un microscopio estereoscópico (10X) con el fin de verificar el proceso del crecimiento del micelio.

## Aislamiento e Identificación morfológica de los hongos

De las placas de Petri. con agar agua y con crecimiento de micelio, se obtuvieron muestras que se depositaron e incubaron en 15 placas de Petri con el medio agar papa dextrosa (20%). La incubación se realizó durante cinco días y posteriormente mediante la técnica de cinta pegante (Díaz *et al.* 1999), se obtuvieron fragmentos del hongo presionando suavemente el lado pegante sobre el micelio del hongo, después se colocó la cinta sobre porta objetos con una gota de azul de lactofenol. Para realizar la identificación morfológica, se observó el micelio teñido con la ayuda de microscopio (Leica DM500®) utilizando los aumentos de 10X, 40X y 100X.

## Secuenciación del gen 28S rARN e ITS

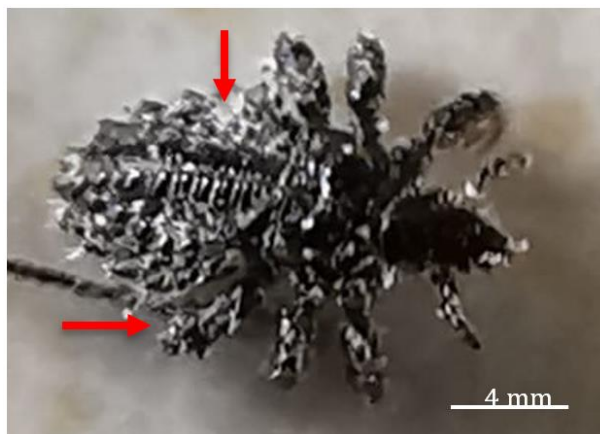
La identificación molecular se realizó en las dos cepas aisladas anteriormente, el ADN genómico de los dos hongos se extrajo macerando 100 mg del micelio con nitrógeno líquido y posteriormente usando el kit de extracción de ADN ZR fungal/bacterial DNA Kit™. Para la identificación molecular se utilizó el gen 28S rARN que fue amplificado usando los oligonucleótidos universales eucarióticos D1 y D2 descritos por Boyandin *et al.* (2013), de igual manera se amplificaron las secuencias conservadas en eucariotas ITS (Internal transcribed spacer) utilizando los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 en las condiciones descritas por White *et al.* (1990). Los productos de amplificación se purificaron del gel utilizando el kit GeneJET (Thermo Scientific®) y se secuenciaron en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Cuernavaca, Morelos, México). Las secuencias obtenidas se depositaron en el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con los números de accesos 28s: D1D2C1 (ON911454) y D1D2C2 (ON911455) e ITS: ITSC1 (ON911478) y ITSC2 (ON911479). Posteriormente, se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias 28S rARN (551 nucleótidos) y para ITS (330 nucleótidos) usando la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information), las secuencias referenciadas fueron alineadas utilizando el software Clustal Omega (Sievers *et al.* 2011). El análisis filogenético de cada matriz de datos se realizó por separado bajo el criterio de neighbor joining con 1 000 bootstrap con el programa seaview 4.6.1 (Gouy 2010).

## RESULTADOS Y DICUSIÓN

El presente estudio reporta el aislamiento de *Neurospora* spp. apartir de un organismo biológico como el piojo *H. tuberculatus* en México. El hongo *Neurospora* spp. es un organismo que ha sido aislado de distintos vegetales y sustratos como el suelo y maderas quemadas (Lee 2012). Aunque existe escasa información, se ha reportado su aislamiento en algunos organismos biológicos de importancia, como larvas de la mosca *Lucilia cuprina* (Benjo *et al.* 2006).

Los piojos *H. tuberculatus* son ectopásitos que han sido reportados como causantes de brotes en bufálos en la región (Ojeda-Robertos *et al.* 2022). En este estudio, además de confirmar la identidad del piojo por medio de claves taxónomicas, se reporta la presencia de micelio blanco y escaso en el cuerpo de los ectoparasitos desde el momento de la colecta; sin embargo, a las 24 h post-colecta, se observó crecimiento e invasión con mayor cobertura (Figura 1), lo que indicó la capacidad del

hongo para colonizar este insecto. Del total de piojos colectados el 76.1%, tuvieron la presencia de crecimiento micelial blanco en su cuerpo (Tabla 1).



**Figura 1.** Piojo adulto *Haematopinus tuberculatus* invadido por el micelio de *Neurospora* spp. (40X) al momento de la colecta. La flecha roja indica zonas en el cuerpo del piojo invadidas con micelio blanco.

**Tabla 1.** Número y porcentaje de *H. tuberculatus* con crecimiento micelial de *Neurospora* spp. en búfalos de Tabasco, México.

Número de animal	Total de piojos colectados	Número de piojos con crecimiento de micelio	Porcentaje de piojos con crecimiento de micelio (%)
1	5	1	20.0
2	5	1	20.0
3	7	6	85.7
4	5	1	20.0
5	5	1	20.0
6	8	8	100
7	5	1	20.0
8	10	10	100
9	10	10	100
10	10	8	80.0
11	5	5	100
12	6	5	83.3
13	7	5	71.4
14	5	5	100
15	5	5	100
16	7	6	85.7
17	4	1	25.0
18	5	5	100
19	10	10	100
20	6	5	83.3
Total	130	99	76.1

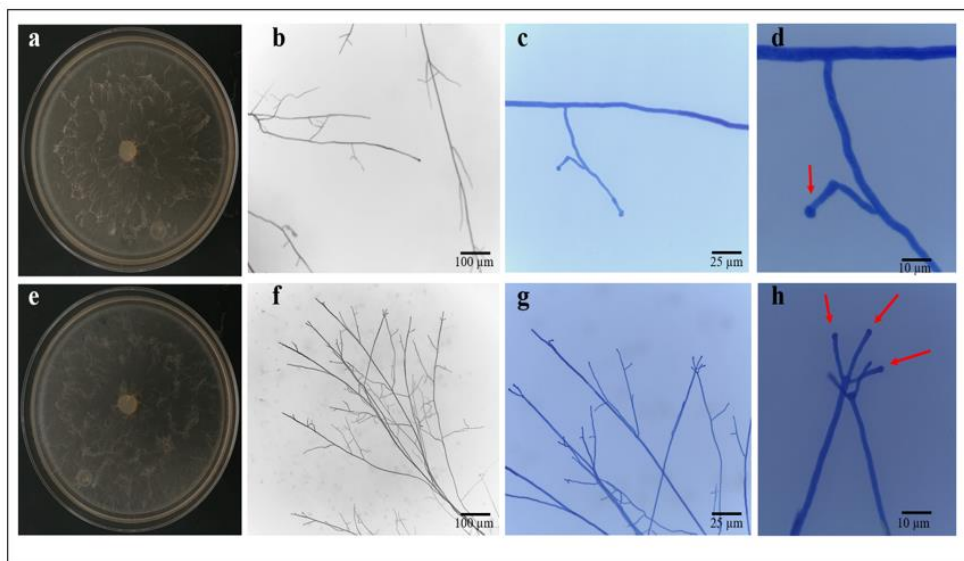
El origen del micelio en el cuerpo de los piojos colectados es difícil de explicar, aunque existen algunas posibilidades, los búfalos de agua como parte de su proceso de termorregulación corporal requieren refrescarse en agua y lodo (Khongdee *et al.* 2011), posiblemente, en el lodo de las lagunas donde los búfalos se termoregulan, entran en contacto junto con sus ectoparásitos con otros organismos vivos como es el caso de los hongos. Aunque también, se ha reportado que, otra fuente del hongo es el suelo y zonas con áreas quemadas (Lee 2012). Sin embargo, algo importante de considerar, es que el ciclo de vida del piojo es corto, se desarrolla de 21 a 27 días y sucede en su totalidad encima del hospedador lo que podría sugerir la capacidad invasiva y el rápido crecimiento del hongo en el cuerpo de los parásitos (Batista *et al.* 2018).

### Morfología macroscópica y microscópica de los hongos

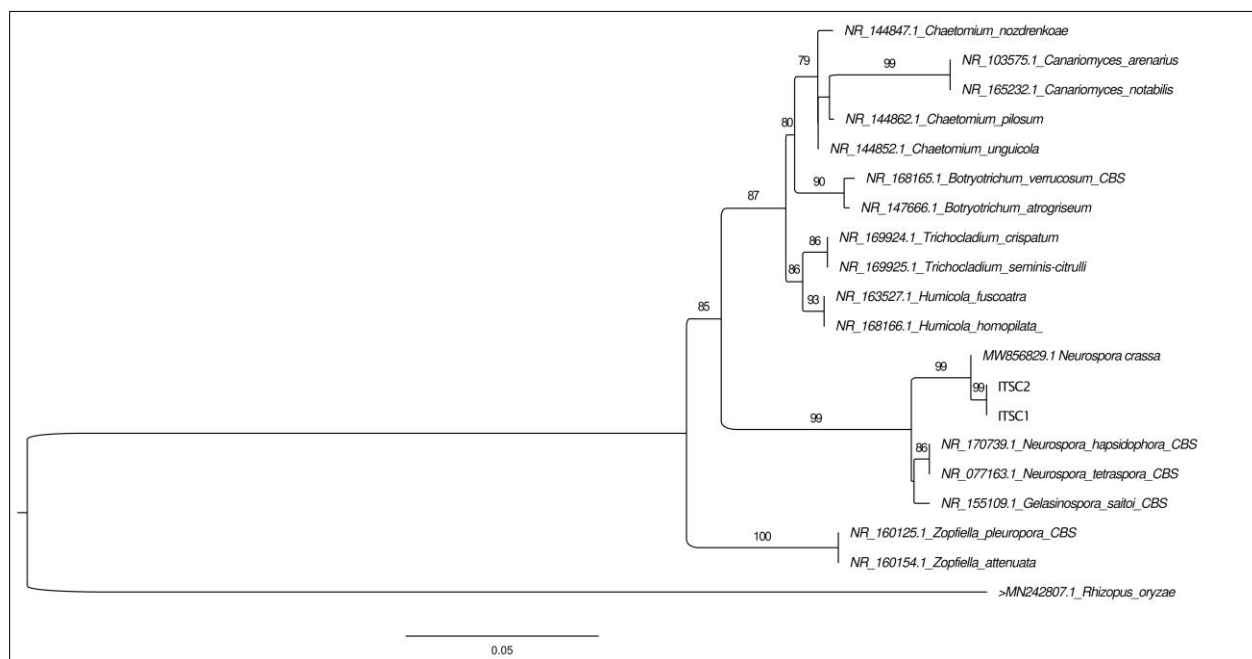
El género *Neurospora* es un grupo de hongos ascomicetos que son comunes en áreas tropicales y subtropicales y su presencia ha sido reportada en varias regiones y países del mundo (Turner *et al.* 2001). En este género, se han identificado varias especies con características morfológicas macroscópicas y microscópicas, las cuales varían dependiendo de la región y del lugar de colecta. En el crecimiento miceliar de las cepas C1 y C2 en el medio PDA, se detectó un micelio blanco, mientras que por microscopía se pudo observar la formación de hifas septadas y la presencia de conidios (de origen asexual), por lo que de acuerdo con estas características macroscópica y microscópica son representativas del género *Neurospora* (Turner *et al.* 2001).

### Identificación molecular

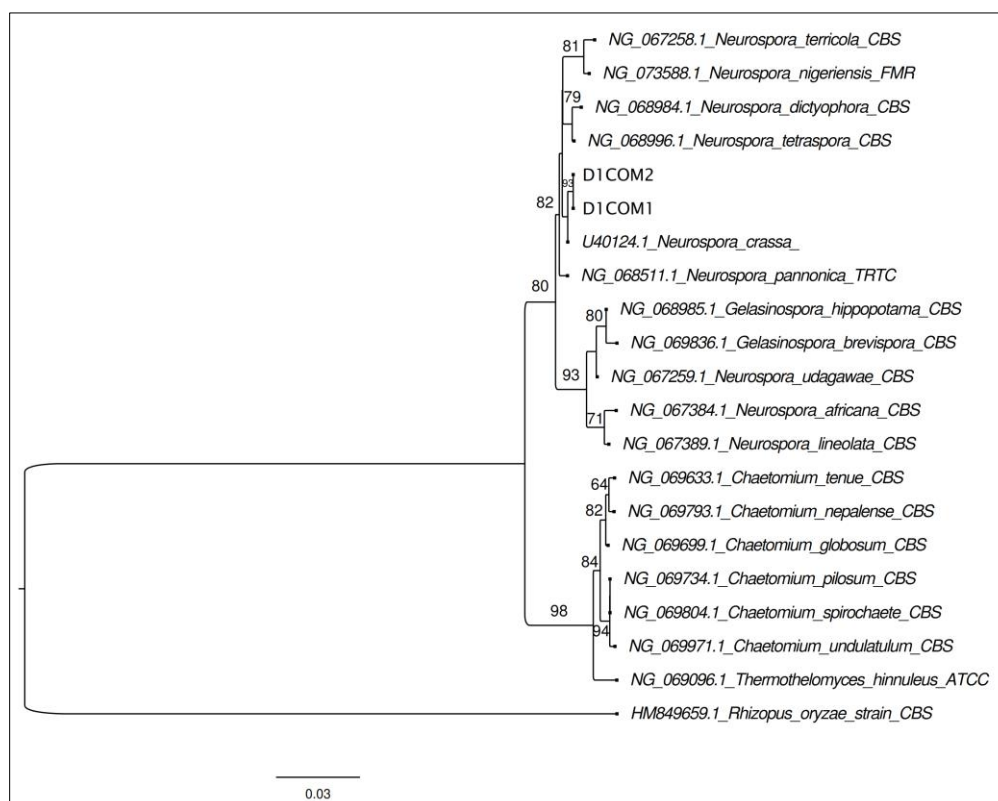
Las secuencias de los genes 28 rRNA y secuencias ITS se analizaron utilizando el algoritmo BLASTn en la base de datos NCBI, donde se alinearon y mostraron una alta similitud con especies del género *Neurospora*. Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando fragmentos de las secuencias del gen 28s rRNA y secuencias ITS referenciadas obtenidas del NCBI. Como se observa en la Figura 2, el análisis filogenético de las secuencias ITS muestra que las cepas C1 y C2 están relacionadas con las especies *N. crassa*, *N. hapsidophora*, *N. tetraspora* y *N. sitoi* con un soporte del 99%, mientras que el análisis filogenético de las secuencias del gen 28s rRNA, muestra que las cepas C1 y C2, están relacionadas con las especies *N. crassa* y *N. pannonica* con un soporte del 93% (Figura 3 y 4). Al respecto, Perkins *et al.* (1976), mencionan que es un hongo común en áreas tropicales, y por lo general, se encuentra en zonas de vegetación quemada. Al parecer las ascoesporas, permanecen durante un tiempo hasta que las altas temperaturas o incluso ciertos químicos las activan (Ferreira *et al.* 2016). Por otra parte, Ferreira *et al.* (2016) mencionan que algunos hongos ascomicetos filamentosos, como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Monascus* spp. y *Neurospora* spp., son versátiles y de distribución cosmopolita y son capaces de crecer en diferentes sustratos, sin embargo, hasta el momento, solo ha sido reportado a partir de un organismo vivo (Bejo *et al.* 2006). Los macroconidios de *Neurospora* spp. se caracterizan por tener una amplia dispersión aérea, pero tienen corta duración de vida en la naturaleza (Lee 2012), lo que posiblemente explique la presencia en el suelo de las praderas y charcas donde los búfalos se refrescaron para termoregularse y ser la vía para la invasión y colonización de los piojos.



**Figura 2.** Caracterización macroscópica y microscópica de dos cepas de *Neurospora* spp. Crecimiento micelial de las cepas C1 y C2 en caja de Petri agar dextrosa (40X) (a y e). Características microscópicas con aumento 10X (b y f), 40X (c y g) y 100X (d y h) respectivamente. La flecha roja indica la presencia de conidios.



**Figura 3.** Análisis filogenético de las cepas C1 (ITS1) y C2 (ITS2) según los resultados de BLAST de las secuencias ITS.



**Figura 4.** Análisis filogenético de las cepas 1 (D1 COM1) y 2 (D1 COM2) según los resultados de BLAST de las secuencias del gen 28S rARN.

Algunas especies pertenecientes al género *Neurospora* spp. han sido descritas en la literatura por su actividad saprobia y su relación con la degradación de plantas (Piontelli y Diaz 2004) lo que explica su actividad menos especializada cuando se compara con otras especies de hongos con actividad entomopatógena (St. Leger y Wang *et al.* 2000). En el presente estudio no fue posible determinar el efecto letal (mortalidad) o subletal (desarrollo embrionógico y oviposición) del hongo sobre la especie de piojo. De acuerdo a lo mencionado anteriormente, estos son parásitos obligados y mueren a las pocas horas después de ser colectados (Egri 2019), por lo que no podemos atribuir la muerte a la presencia e invasión del hongo, sino a la falta del hospedero.

En un estudio realizado por St Leger *et al.* (1997) se comparó la habilidad de hongos saprófitos, entre ellos *N. crassa* y *A. nidulans*, con otros hongos oportunistas, patógenos de plantas y entomopatógenos para utilizar los componentes de las paredes celulares de las plantas y cutícula de insectos en diferentes medios nutritivos y se reportó que *N. crassa* a pesar de ser un saprófito, secreta proteasas capaces de degradar mucina (Leger *et al.* 1997), por lo que podría tener una actividad entomopatógena, sin embargo, esto debe ser estudiado. Estudios previos han demostrado que la mucina es esencial para el desarrollo embrionológico (Syed *et al.* 2008) y la oviposición de los insectos (Lou *et al.* 2019), en futuros estudios será necesario evaluar el efecto letal y subletal que podría producir *Neurospora* spp. sobre *H. tuberculatus* y conocer su papel en el control biológico de este piojo que afecta a la producción bufalina de México. Al respecto, Liu y Yang (2023), mencionan que las interacciones entre los micrororganismos y algunos invertebrados del

suelo pueden establecer relaciones predador-presa y dar origen a interacciones más complejas, sin embargo, dada la biodiversidad de la biota muchas de estas interacciones aún no han sido estudiadas, por lo que este estudio presenta el aislamiento de un hongo en un sustrato no estudiado previamente.

El presente estudio reporta el hallazgo de un hongo perteneciente al género *Neurospora* encontrado en el cuerpo de piojos *H. tuberculatus*, los cuales fueron colectados de búfalos de agua. La identidad del hongo fue confirmado mediante morfología y secuenciación de marcadores moleculares, por lo que es importante continuar con estudios que ayuden a comprender la relación biológica entre el hongo y los piojos.

## AGRADECIMIENTOS

A los propietarios y trabajadores del rancho, por su incondicional apoyo por sus atenciones, disposición, paciencia y colaboración durante la fase de campo.

## CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

## LITERATURA CITADA

- Alonso-Díaz MA, Fernández-Salas A (2021) Entomopathogenic fungi for tick control in cattle livestock from Mexico. *Frontiers in Fungal Biology* 2: 657694. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.657694>
- Barron GL (1977) The nematode-destroying fungi. Canadian Biological Publications Ltd. Guelph, Ontario, Canada. 140p.
- Batista HR, Sarturi C, Stelmachtchuk FN, Oliveira DR, Morini AC, Gennari SM, Minervino AHH (2018) Prevalence and risk factors associated with ectoparasite infestation of buffaloes in an Amazonian ecosystem. *Parasites & Vectors* 11: 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2917-2>.
- Benjo AD, Lawal OA, Akintola OI (2006) Bacteria and fungi associated with *Lucilia cuprina* (sheep blowfly) larvae. *Research Journal of Agriculture & Biology Science* 2(6): 358-364.
- Boyandin AN, Prudnikova SV, Karpov VA, Ivonin VN, Lanh Đôn, Nguyễn TH, Hiệp Lê T, Filichev NL, Levin AL, Filipenko ML, Volova TG, Gitelson II (2013) Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* 83: 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.04.014>.
- Díaz R, Gamazo C, López-Goñi I (1999) Manual práctico de microbiología. 2da Edición. Editorial Masson SA. Barcelona, España. 208p.
- Ebani VV, Mancianti F (2021) Entomopathogenic fungi and bacteria in a veterinary perspective. *Biology* 10(6): 479. <https://doi.org/10.3390/biology10060479>
- Egri B (2019) Louse infestation of ruminants. *Bovine Science - A Key to Sustainable Development*. IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.79257. Fecha de consulta: 23 de enero de 2024.

- Ferreira JA, Mahboubi A, Lennartsson PR, Taherzadeh MJ (2016) Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: present status and future prospects. *Bioresource Technology* 215: 334-345.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Bibliology Evolution* 27(2): 221-224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Hernández-Velasco A, Sánchez-Montes S, Romero-Salas D, Cruz-Romero A, Jiménez-Hernández JA, Becker I, Aguilar-Domínguez M, Pérez de León A (2020) First record of natural infection with *Anaplasma marginale* in sucking lice infesting the water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Mexico. *Parasitology Research* 119: 3853-3856.
- INEGI (2019) Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, Tabasco, Centro. Instituto Nacional de Estadística Geografía e informática, México. <https://www.inegi>. Fecha de consulta: 23 de enero de 2024.
- Jinu MV, Jayabaskaran C (2015) Diversity and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Saraca asoca*. *Current Research in Environmental & Applied Mycology* 5: 169-179.
- Khongdee T, Sripoon S, Vajrabukka C (2011) The effects of high temperature and wallow on physiological responses of swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*) during winter season in Thailand. *Journal of Thermal Biology* 36: 417-421. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2011.07.006>
- Lee K (2012) Asexual and sexual developments of *Neurospora crassa* on natural substrata. *Fungal Ecology* 5(2): 223-229. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.09.001>.
- Liu R, Yang B (2023) Editorial: Soil microbe-arthropod interactions under global change. *Front Microbiology* 14:1280103. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1280103>
- Lou YH, Shen Y, Li DT, Huang H, Lu JB, Zhang CX (2019) A mucin-like protein is essential for oviposition in *Nilaparvata lugens*. *Front Physiology* 10: 551. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00551>
- Meleney WP, Kim KC (1974) A comparative study of cattle infesting *Haematopinus*, with redescription of *H. quadripertusus* Fahrenholz, 1916 (Anoplura: Haematopinidae). *The Journal of Parasitology* 60: 507-522.
- Neglia G, Veneziano V, De Carlo E, Galiero G, Borriello G, Francillo M, Campanille G, Zicarelli L, Manna L (2013) Detection of *Brucella abortus* DNA and RNA in different stages of development of the sucking louse *Haematopinus tuberculatus*. *BMC Veterinary Research* 9: 1-9.
- Ojeda-Chi MM, Rodríguez-Vivas R I, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutierrez R, Cruz-Vázquez C (2011) Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari:Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae): Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 2:177-192.
- Ojeda-Robertos N, Peralta-Torres JA, López-Hernández KG, Chay-Canul AJ, Ojeda-Chi MM, Rodríguez-Vivas RI (2022) Pediculosis por *Haematopinus tuberculatus* en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*). *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 9(3): e3283. <https://doi.org/10.19136/era.a9n3.3283>.
- Perkins DD, Turner BC, Barry EG (1976) Strains of *Neurospora* collected from nature. *Evolution* 30(2): 281-313. <https://doi.org/10.2307/2407702>
- Piontelli E, Díaz MC (2004) El entorno humano y la relevancia biológica de las especies de *Neurospora*: consideraciones en micología médica. *Boletín Micológico* 19: 1-11. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2004.19.0.288>
- Romo-Martínez A, Fernández-Ruvalcaba M, Hernández-Velázquez VM, Peña-Chora G, Lina-García LP, Osorio-Miranda J (2013) Evaluation of natural origin products for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle artificially infested. *Basic Research Journal of Agricultural Science and Review* 2: 64-79.

- 340 Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J,  
341 Thompson JD, Higgins DG (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence  
342 alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
- 343 St Leger RJS, Joshi L, Roberts DW (1997) Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic,  
344 phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches.  
345 *Microbiology* 143(6): 1983-1992.
- 346 St. Leger RJ, Wang JB (2020) *Metarhizium*: jack of all trades, master of many. *Open Biology* 10: 200307.  
347 <https://doi.org/10.1098/rsob.200307>
- 348 Syed ZA, Härd T, Uv A, Van Dijk-Härd IF (2008) A potential role for *Drosophila* mucins in development and  
349 physiology. *PLoS One* 3(8): e3041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003041>
- 350 Turner BC, Perkins DD, Fairfield A (2001) *Neurospora* from natural populations: a global study. *Fungal*  
351 *Genetic Biology*. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1247>
- 352 Veneziano V, Neglia G, Cimmino R, Balestrieri A, Rufrano D, Bastianetto E, Santoro M, Gokbulut C (2013)  
353 The efficacy and safety of alphacypermethrin as a pour-on treatment for water buffalo (*Bubalus bubalis*)  
354 infested with *Haematopinus tuberculatus* (Phthiraptera: Haematopinidae). *Parasitology Research* 112:  
355 2907-2912. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3462-8>
- 356 White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes  
357 for phylogenetics, In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR protocols-A guide to*  
358 *methods and applications*. Academic Press. San Diego California, USA. pp. 315-322.