



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS
DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS Y FORESTALES**

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS
EN GARRAPATAS *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* EN
GANADO BOVINO EN MICHOACÁN**

MVZ. ELISA VALDEZ MARTÍNEZ

TESIS

**PRESENTADA PARA OBTENER GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. EN BIOTECNOLOGÍA
MICROBIANA: ERNESTINA GUTIÉRREZ VÁZQUEZ**

MORELIA, MICHOACÁN. AGOSTO DE 2014



**INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS
Y FORESTALES**

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero reconocimiento y agradecimiento a

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por proporcionarme los recursos económicos para la realización de este proyecto.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por facilitar las instalaciones para la realización de este proyecto, así como al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales y Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” por ser el medio para que se realizará gran parte de este trabajo y ser la fuente de los conocimientos que adquirí para mi desarrollo profesional.

A Dra. Ernestina Gutiérrez Vázquez y Dra. Margarita Vargas Sandoval por ser guías de conocimientos para esta investigación, por brindarme su confianza, amistad y apoyo incondicional, gracias, me sentí respaldada.

A Universidad de Colima y Dr. Roberto Lezama, por compartir sus conocimientos y asesorías, así como facilitar las cepas de la colección de Laboratorio de Control Biológico para esta investigación.

A los Grupos Ganaderos de los municipios de Indaparapeo, Queréndaro y Tzitzio de la Estrategia Pecuaria 2012-2013, por facilitar sus instalaciones, sus animales y su tiempo. Así como los tesisistas, estudiantes y trabajadores que colaboraron para que se llevara a cabo este trabajo.

Al comité tutorial Dr. Aureliano Juárez Caratachea, Dr. Guillermo Salas Razo y Dr. Rogelio Garcidueñas Piña por sus asesorías académicas y aportaciones valiosas para que el trabajo de investigación fuera de calidad.

A todos aquellos personajes profesionales del área con los que coincidí en algún momento y que desinteresadamente compartieron sus conocimientos conmigo, a mis amigos y familia que con sus buenos deseos, risas, abrazos y palabras de aliento, sé que estuvieron a la par conmigo y al pie del cañón, los amo. A ti mi confidente, mi espejo, mi “body” de vida, gracias por existir y cobijarme, te amo.

A mis dos grandes estrellas, esas dos inspiraciones de vida, que fueron los dos grandes ángeles que desde el cielo permitieron que las piezas se acomodarán y

esto sucediera, mis dos grandes maestros que me mostraron el camino del trabajo, del esfuerzo, de la transparencia, de la humildad, del desapego y del amor, gracias papi y mami, los amo.

“Sólo hay dos formas de vivir la vida. Una es como si no existieran los milagros. La otra como si todo fuera un milagro”

ALBERT EINSTEIN

GRACIA

*“Ver un mundo en un grano de arena,
y un cielo en una flor silvestre,
aprender el infinito en la palma de la mano,
y la eternidad en una hora”*

WILLIAM BLAKE

INDICE

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	4
Generalidades de las garrapatas	5
Taxonomía	6
Distribución	6
Morfología	7
Epidemiología	8
Hábitos y ecología	9
Ciclo biológico <i>R. microplus</i>	10
Métodos de control	11
Control biológico	12

Hongos entomopatógenos	13
Taxonomía de los hongos entomopatógenos	13
Características de los hongos entomopatógenos	13
Mecanismo de acción patogénica de los hongos entomopatógenos	15
Toxinas entomopatógenas	17
Ambiente- Hongos entomopatógenos	18
Géneros más importantes	19
<i>Metharizium anisopliae</i>	19
<i>Cordyceps bassiana</i> (= <i>Beauveria bassiana</i>)	21
<i>Isaria fumosorosea</i> (= <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>)	22
Objetivo general	24
Objetivos específicos	24
Hipótesis	25
Bibliografía	26

Resultados	36
Artículo I. Evaluación de la eficacia de <i>Metarhizium anisopliae</i>, <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> en huevos y adultos de garrapatas (<i>R. microplus</i> y <i>A. cajennense</i>)	36
Resumen	36
Introducción	37
Materiales y métodos	39
Resultados y discusión	40
Conclusiones	42
Bibliografía	43
Artículo II. Evaluación <i>in vitro</i> de la eficacia de <i>Metarhizium anisopliae</i>, <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> en garrapatas (<i>R. microplus</i>) en Michoacán	46
Resumen	46
Introducción	47

Materiales y métodos	49
Resultados y discusión	50
Conclusiones	52
Bibliografía	53
Artículo III. Evaluación de la eficacia de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sor. en garrapatas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> en ganado bovino en Michoacán	56
Resumen	56
Introducción	57
Materiales y métodos	58
Resultados y discusión	60
Conclusiones	67
Bibliografía	68

RESUMEN

Las garrapatas son vectores reconocidos de microorganismos patógenos para el ganado bovino, así como del hombre, además de provocar pérdidas económicas a la producción ganadera debido a la utilización de insumos para controlar este tipo de parásitos. Las estrategias para el control de la garrapata en la actualidad, se han modificado, en base a la adaptación que estas han registrado últimamente, en referencia al control químico, que es uno de los más utilizados en la producción bovina. Numerosos estudios han demostrado que este tipo de parásitos han presentado resistencia al control químico y una de las alternativas sustentables de control, es la utilización de hongos entomopatógenos (HE) como control biológico. Este trabajo de investigación se enfocó en la utilización de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., *Beauveria bassiana* (= *Cordyceps bassiana*) *bassiana* (Bals.) Vuill., *Isaria fumosorosea* (= *P. fumosoroseus* (Wise) en garrapatas, se dividió en partes la investigación, dando como resultado: 3 artículos. En el artículo I se trabajó con cepas diferentes de HE y sus combinaciones en garrapatas adultas y huevos de garrapata (*R. microplus* y *A. cajennense*) nativos del estado de Colima *in vitro* a concentración de 1×10^8 conidias/ml. En el artículo II se trabajó con HE de cepas diferentes y sus combinaciones en garrapatas adultas nativas del estado de Michoacán *in vitro*, también a 1×10^8 conidias/ml. Estos primeros bioensayos se realizaron en laboratorio bajo condiciones controladas, los resultados mostraron que una cepa de *Metarhizium anisopliae* (Ma198) obtuvo el porcentaje mayor de eficacia para el control de garrapata *in vitro*. Así que, en el artículo III, se aplicó el tratamiento de Ma198 en garrapatas que se encontraban parasitando al ganado bovino de forma natural, en praderas del estado de Michoacán, en 7 hatos de bovinos de doble propósito, se aplicó el tratamiento cada 15 días con HE a una concentración de 1×10^8 conidias/ml, por un total de 6 baños de aspersión. Los resultados en laboratorio demostraron una eficacia de mortalidad mayor de 90%, con las cepas más virulentas y bajo condiciones controladas; por otro lado, en condiciones de praderas infestadas naturalmente se presentó una eficacia de mortalidad de 90% después de 6 aplicaciones cada 15 días con baños de aspersión sobre cada bovino.

Palabras clave: *Metarhizium anisopliae*, control biológico, garrapata, bovino.

ABSTRACT

Ticks are vectors of recognized pathogenic microorganisms for the cattle, as well as of man, in addition to cause economic losses to livestock production due to the use of inputs to control this type of parasites. Strategies for the control of the cattle tick in the present, have been modified, on the basis of the adaptation that these have been lately, in reference to chemical control, which is one of the most used in the production of cattle. Numerous studies have shown that this type of parasites have been resistant to chemical control and one of the sustainable alternatives of control, is the use of entomopathogenic fungi (HE) as biological control. This research work focused on the use of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sr., *Beauveria bassiana* (= *Cordyceps bassiana*) *bassiana* (Bals.) Vuill., *Isaria fumosorosea* (= *P. fumosoroseus* (Wise) in ticks, was divided into parties research, resulting in: 3 articles. In the article I was working with different strains of HE and their combinations in adult tick and eggs (*R. microplus* and *A. cajennense*) native of the state of Colima *in vitro* to concentration of 1×10^8 conidia/ml. In the article II have to work with different strains HE and their combinations in adult ticks native of the state of Michoacán *in vitro*, also to 1×10^8 conidia/ml. These first bioassays were performed in the laboratory under controlled conditions, the results showed that a strain of *Metarhizium anisopliae* (Ma198) obtained the highest percentage of effectiveness for the control of tick *in vitro*. So, in article III, the treatment was applied in Ma198 in ticks that were parasitizing the cattle in a natural way, in meadows of the state of Michoacán, in 7 herds of cattle of dual purpose, treatment was administered every 15 days with HE have a concentration of 1×10^8 conidia/ml, for a total of 6 bathrooms of spraying. The results in the laboratory showed a effectiveness of higher mortality of 90 %, with the most virulent strains and under controlled conditions; on the other hand, in conditions of course infested grassland was presented a effectiveness of mortality of 90% after 6 applications every 15 days with bathrooms of spraying on each bovine.

Key Words: *Metarhizium anisopliae*, biological control, tick, bovine.

RESUMEN

El trabajo de tesis se condensa en tres artículos de investigación que se realizaron conforme se fueron alcanzando los objetivos y obteniendo resultados. En el **artículo I**, se realizaron 2 bioensayos donde se evaluó la eficacia de cepas de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)Sor., *Cordyceps bassiana* (= *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Ascomycetes: Clavicipitaceae) e *Isaria fumosorosea* (= *P. fumosoroseus* (Wise) (Ascomycota: Cordycipitaceae) para el control de garrapatas *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) (Canestrini) y *Amblyomma cajennense* (*A. cajennense*) (Fabricius) del estado de Colima, México con el objetivo de extraer de entre ellas las cepas más viables para el control de garrapata. En el primer bioensayo se formaron grupos de 5 garrapatas adultas en cada caja de Petri, 30 de *R. microplus* y 30 de *A. cajennense* sometidas a Ma34, Ma198, Ma181, Ma14 de *Metarhizium anisopliae*, Bb174 y Bb249 de *Beauveria bassiana* a la concentración de 1×10^8 ; en el segundo bioensayo se formaron grupos de 20 huevos de *R. microplus* en cada caja de Petri con 4 repeticiones asperjados con 8 tratamientos con las cepas individualmente y sus mezclas (Ma198 de *Metarhizium anisopliae*, Bb249 de *Beauveria bassiana*, Pfr13 de *Paecilomyces fumosoroseus*, Bb249+Ma198, Pfr13+Ma198, Bb249+Pfr13 y Bb249+Ma198+Pfr13) y el grupo testigo asperjado con agua y Tween 80; después de la inoculación se dejaron en incubación a 25°C y cada 5 días se registró el número de garrapatas y huevos muertos por micosis. Los resultados indicaron en el primer bioensayo los grupos de garrapatas adultas tratados con los 6 tratamientos demostraron a Ma198 con un 80% de efectividad en *A. cajennense* y 100% en *R. microplus*. Los huevos de *R. microplus* sometidos a 8 tratamientos mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) donde Ma198, Bb249+Ma198, Pfr13+Ma198 y Bb249+Pfr13+Ma198 mostraron efectividad de 95 al 100%. Estos resultados demostraron que Ma198 se puede emplear como alternativa para control biológico en adultos de *R. microplus* y *A. cajennense* y en huevos de *R. microplus*. En el **artículo II**

se realizó un bioensayo, con el objetivo de determinar la cepa más eficaz para el control biológico de la garrapata del estado de Michoacán en base a los resultados de los primeros bioensayos (art.I). En el bioensayo se formaron grupos de garrapatas adultas procedentes del estado de Michoacán, México. Se transportaron al laboratorio, las garrapatas de *R. microplus* se formaron en grupos de 20 en cada caja de Petri con 4 repeticiones que fueron inoculadas mediante la técnica de inmersión durante 5 seg con 8 tratamientos de cepas a la concentración de 1×10^8 conidios/ml, donde se aplicaron las cepas individualmente y sus mezclas (Ma198 de *Metarhizium anisopliae*, Bb249 de *Beauveria bassiana*, Pfr13 de *Paecilomyces fumosoroseus*, Bb249+Ma198, Pfr13+Ma198, Bb249+Pfr13 y Bb249+Ma198+Pfr13) y el grupo testigo asperjado con agua y Tween 80; después de la inoculación se dejaron en incubación a 25°C y cada 5 días se registró el número de garrapatas muertas por micosis. Los resultados demostraron que la cepa Ma198 fue la más virulenta con 97.5%, seguido por 93.7% de virulencia con las cepas Pfr13 y Ma198+Bb249+Pfr13 en *R. microplus* en adultos, los diferentes tratamientos mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) donde Ma198, Pfr13 y Ma198+Bb249+Pfr13 con efectividad (93.7 a 97.5%). En el **artículo III** el objetivo fue evaluar la efectividad de la Cepa Ma198 por baños de aspersion en el ganado bovino ya que se había determinado la eficacia de dicha cepa en base a los resultados de los primeros bioensayos (art. I y art. II). El trabajo de investigación se realizó en 7 hatos con bovinos de doble propósito con animales de todas las edades en cada hato, “El Capire”, “El Naranja”, “El Capulín”, “Cuicateo” pertenecientes a la tenencia de Tafetan, municipio de Tzitzio, “La Arpita” perteneciente al municipio de Indaparapeo, “Los Puchotes” y “Rincón de Zetina” pertenecientes al municipio de Querendaro. Las razas que se utilizaron Suizo, Brahman, Cebú y Criollo. Para determinar las unidades de muestreo se determinó que éstas tuvieran el cuerpo con evidente infestación de garrapatas. Los hongos fueron cultivados en agar dextrosa (SDA) Sabouraud, incubados a 25°C y 70% HR por 3 semanas y los conidios fueron extraídos para obtener una concentración de 1×10^8 conidios/ml, la cual se diluyó en 0.1% de Tween 80. La cepa Ma198, se roció a los animales siempre a favor del viento, en contra de la dirección del pelo y después de las cinco de la tarde. Se aplicaron 6 baños cada 15 días. Se evaluaron los animales contando el número de garrapatas que

tienen en el cuerpo, realizando este conteo de todo el lado izquierdo en un plano medial con ayuda de un contador, tomando registros con intervalos de 15 días cada uno. Los resultados del conteo de garrapatas obtenidos se sometieron a análisis estadístico de diagrama de dispersión con una función cuadrática o también llamada de segundo grado $Y=Ax^2+Bx+C$. El ganado en el estado de Michoacán demostró una decreciente población de garrapata *R. microplus* en donde el promedio general de inicio fue de 106.33 garrapatas y terminaron con un promedio general de 7.95 garrapatas promedio por bovino al finalizar los tratamientos. Por lo tanto, haciendo un análisis de los tres estudios que se realizaron, se determina que la cepa198 es eficaz como tratamiento de control biológico de *R. microplus*, tanto *in vitro* como en el ganado bovino directamente en praderas abiertas cabe mencionar que es necesario que se realicen más investigaciones en diferentes explotaciones ganaderas, para identificar, los productos a los que ya son resistentes las garrapatas; también valorar la Cepa Ma198 por un período experimental más amplio. Determinar el efecto de la Cepa Ma198 en otras localidades con problemas de garrapata, donde se incluyan grupos testigo; así como realizar investigaciones comparativas de tratamientos con control biológico y químico.

INTRODUCCION GENERAL

La ganadería bovina es la principal fuente de ingresos de alrededor de 200 millones de familias de pequeños productores en Asia, África y América Latina, y la única fuente de subsistencia para al menos 20 millones de familias. En estos sistemas, los principales problemas que se enfrentan son una creciente degradación de las pasturas y su consecuente pérdida de productividad, la deforestación, una creciente dependencia de insumos externos, tecnología y material genético, la amenaza del cambio climático, alta incidencia de enfermedades y deficiencias de organización y comercialización (FAO, 2014). La ganadería bovina constituye una fuente de alimento básico de importancia mundial. Se estima que los rumiantes aportan el 70% de la proteína consumida por el hombre (Minson, 1990). En el mundo se reporta una población bovina de 1399 millones de cabezas, en América una población de 488 millones de cabezas en 2004 (FAO, 2009). El estado de Michoacán registra 1 004 565 cabezas de bovinos en 2007, de éstas, el municipio de Queréndaro registra 2935, Indaparapeo, 2857 y Tzitzio, 14066 (INEGI, 2007).

Se sabe que la producción bovina se encuentra limitada por problemas causadas por parasitosis y enfermedades. Las garrapatas constituyen el ectoparásito más importante de la ganadería mundial *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: (*R. microplus*) (Canestrini) producen el mayor problema en la ganadería bovina de las regiones tropicales y subtropicales, donde sus climas son favorables para la supervivencia de las garrapatas (Jonsson, 1997). El impacto económico se debe al daño causado a las pieles por acción de las picaduras, pérdida de sangre, efectos tóxicos, reducción en la producción de leche y carne, en la producción de becerros y el incremento en los costos de control; además de los agentes etiológicos que transmiten como: virus, bacterias, rickettsias y protozoos (Ojeda-Chi *et al.*, 2011).

El control de garrapata se basa principalmente en el uso de ixodicidas; sin embargo, su uso irracional ha propiciado la aparición de garrapatas resistentes a las principales familias de ixodicidas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006ab, 2007). Por la demanda de alimentos libres de residuos químicos y por el cuidado del ambiente, se sugiere la utilización de sistemas alternativos de control entre los que se pueden contar el empleo de nematodos (Hill, 1998), vacunas (Jonsson *et al.*, 2000), bacterias (Hassanain *et al.*, 1997), aceites esenciales (Prates *et al.*, 1998) y hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* (*B. bassiana*) y *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae*) (López *et al.*, 2009). Se tiene reportado que estos hongos causan mortalidad en garrapatas adultas, a la vez que disminuyen su fecundidad (Kaaya y Hassan, 2000; Benjamín *et al.*, 2002; Da Costa *et al.*, 2002).

Generalidades de las garrapatas

Existen dos grupos de parásitos, los endoparásitos (internos) y los ectoparásitos (externos). Un tipo de parásito externo es la garrapata; su característica es la hematofagia y los daños que ocasiona en los animales infestados están determinados por diversos factores como: la succión de sangre, de la acción tóxica por la secreción de las glándulas salivales y de la transmisión de las numerosas enfermedades (Borchert, 1981; Ocádiz, 1995), conviene señalar, que varias especies de estos ácaros requieren de uno, dos y hasta más hospederos, para completar su ciclo de vida relativamente corto (Garris, 1991).

Las garrapatas están distribuidas por todo el mundo e intervienen como transmisoras de agentes patógenos para el humano y los animales (Jonsson, 1997; González, 2006). Además, sirven de vectores biológicos o mecánicos para la transmisión de entidades nosológicas importantes (Vega y Murguía, 1993). Se ha estimado que la mitad del ganado a nivel mundial es infectado por enfermedades tales como anaplasmosis y babesiosis transmitidos por diversos géneros de garrapatas, que

son la principal limitante en la producción animal, sobre todo en regiones subtropicales y tropicales (Hostis y Seegers, 2002). Se ha estimado que las pérdidas económicas son de \$7,000 millones USD anuales a nivel mundial y \$48 millones USD de pérdida anual en México (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2007).

Taxonomía

Las garrapatas son ácaros cosmopolitas, por su gran tamaño (al menos en estado adulto) resultan observables a simple vista. Según la clasificación más reciente, las garrapatas pertenecen a la subclase Acari, del superorden Parasitiformes dentro del orden Ixodida (Lindquist *et al.*, 2009). El orden Ixodida está formado por tres superfamilias: Argasoidae (193 especies), Ixodoidae (702 especies) y Nuttallielloidae (monotípico) (Evans, 1992). En México, de las garrapatas duras se registraron 52 taxones válidos, desde entonces se han adicionado 23, haciendo un total de 75 especies incluidas en 5 géneros (Guzmán-Cornejo *et al.*, 2007; Vargas *et al.*, 2007; Guzmán-Cornejo y Robbins, 2010). En la Región de Tierra Caliente, Michoacán se observó la presencia de garrapata de la especie *R. microplus* en 93.3% de los hatos muestreados (Cabrera, 2003).

Distribución

La familia de los ixódidos adquirió adaptaciones ecológicas y biológicas que les permitieron pasar a explotar hospedadores en hábitat abiertos. Para estas especies la entrada en contacto con los hospedadores es su mayor problema, pues para que se produzca el contacto, necesita que pase un animal por el lugar concreto en el que se encuentran; de no producirse ese paso, los parásitos mueren en un corto plazo al estar directamente expuestos a los riesgos del ambiente. El hombre favoreció este contacto, mediante el mantenimiento de un número elevado de animales en pequeños espacios. Por lo tanto, las garrapatas que tenían como hospedadores herbívoros silvestres, fueron beneficiadas pues los rumiantes domésticos sustituyeron con ventaja a los

silvestres originales, tanto por su número como por la regularidad de su permanencia siempre en sus mismos campos. Los animales silvestres son factores intermedios que participan en la distribución de especies como *Amblyomma v.*, ya que las infestaciones ocurren por la migración rutinaria (Norval *et al.*, 1997).

Morfología

Las garrapatas presentan el cuerpo en forma de saco, globoso o aplanado, esto va a depender de que los ejemplares estén alimentados o en ayunas. El tamaño corporal también varía (de 2 a 8 mm hasta 1 a 2 cm) según estado fisiológico. Perciben temperatura, humedad, olor y vibraciones, entre otros estímulos. Estos ácaros presentan dos partes diferenciales visibles: el tronco globoso y extremidades articuladas. La parte anterior, no es una cabeza propiamente dicha, ya que el cuerpo de la garrapata es una sola masa; tiene un conjunto de pies móviles que forman el gnathosoma y una base que mide 0.4 cm de largo por 0.9 mm de ancho; por encima de este, se observan dos depresiones llamadas áreas porosas, de las cuales sobresalen dos ganchos denominados quelíceros que ayudan a romper la piel del hospedero (Hoskins, 1991).

Enseguida, aparecen las extremidades con seis artejos: coxa, trocánter, femúr, tibia, pretarso y tarso. Es necesario señalar que los adultos y las ninfas poseen estigmas y se sitúan en el último par de coxas, mientras que las larvas carecen de ellas; además, presentan dimorfismo sexual, el macho es de menor tamaño que la hembra. Cada extremidad mide en promedio, de 10 a 12 mm en las hembras y de 3 a 4 mm en los machos. La parte posterior del ácaro se denomina propositoma (Cupp, 1991).

La garrapata de *R. microplus* (Canestrini) presenta espina caudal por el dorso, que puede observarse ventralmente. La coxa I, presenta dos espolones en forma de triángulo; el interno es más ancho y largo que el externo. Las coxas II y III, presentan dos espolones de borde semiredondo y una escotadura, de donde se origina una

espina hacia el extremo interno. Las placas accesorias son agudas en su borde posterior y dejan visible la espina caudal. Se puede señalar que entre la hembra y el macho existe diferencia en la coxa I, ya que la hembra, es casi tan larga como ancha y los espolones son redondos. Por otra parte, la coxa IV puede poseer un pequeño espolón o carecer de él (Cupp, 1991; Falk-Vairant *et al.*,1994).

Epidemiología

La relevancia de las garrapatas reside en la diversidad de daños que provocan (pérdida de peso, daño en las pieles). La garrapata es un parásito externo que se alimenta de sangre, que ocasiona múltiples daños en los animales infestados, tales como, anemia, pérdida de peso, disminución de la producción de leche, disminución en la ganancia de peso y problemas reproductivos (Cordero del Campillo *et al*, 1999), además, Cabrera (2003) indica que el daño en las pieles se estiman en 5% de su peso total corporal.

Se considera que una garrapata puede llegar a succionar 0.5 a 2 ml de sangre durante el período de infestación en su ciclo de vida (Quiroz, 1993). Se ha calculado que por cada animal infestado se pierde entre 25 a 60 kg de peso vivo al año; la mortalidad de bovinos con infestaciones mayores de 78 a 103 garrapatas durante un período de 4 a 6 semanas se calcula de 0.4 a 0.6 % (Castellanos, 1993).

Los daños a los hospedadores se traducen en una caída en el rendimiento de los animales: a) destrucción tisular con formación de un absceso y la inflamación de los tejidos en los alrededores de los puntos de fijación. Las consecuencias de la inflamación dependen del lugar afectado: dolor, cojera, trastornos visuales y auditivos, parálisis facial y de los párpados son solo algunas citadas en bovinos. Pérdida de pelo por rascado y la infección por bacterias y larvas de mosca, b) parálisis y acciones tóxicas causadas por algunos componentes salivales, c) pérdida de sangre: cada hembra puede expoliar hasta 2 a 4 g de sangre, lo que explica bajo índice de

hematocrito, los linfocitos y eosinófilos aumentan, los neutrófilos disminuyen y se inhibe la síntesis proteíca; anemias agudas, d) transmisiones de enfermedades: las garrapatas actúan de vectores de virus (encefalomielitis), rickettsias (anaplasmosis), bacterias (*Staphylococcus aureus*), protozoos (*Theileria*, *Babesia*) y helmintos (filarias), por mencionar algunas enfermedades (Munderloh y Timothy, 1995; Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Hábitos y ecología

Los factores ambientales que influyen en la distribución y supervivencia de la garrapata es el tipo de clima y microclima. Las garrapatas pueden vivir desde el nivel del mar hasta los 2, 600 msnm y con fluctuaciones de lluvia de 400 a 2800 mm anuales. En las zonas tropicales, con lluvias regulares, alta humedad (mínimo de 60%) y clima cálido (15 y 35° C), se dan las condiciones óptimas para el desarrollo de varias generaciones de garrapatas por año, de modo que la plaga se hace sentir constantemente (Davey *et al.*, 1997).

Normalmente las larvas suben a las plantas de los pastizales para facilitar el acceso a los hospederos, moviéndose horizontalmente hasta 8 m de su sitio original. Este movimiento es debido a que sus órganos sensoriales perciben bióxido de carbono y feromonas de los animales hospederos, hacia los cuales pueden provocar dicho desplazamiento y ataque. En regiones subtropicales, caracterizadas por temporadas de lluvias y sequías, la intensidad de la plaga es fluctuante. Un auge de infestaciones se presenta cada vez, después de un período de condiciones climáticas adversas, sobreviene una temporada calurosa y húmeda. Es en ese momento que se produce una explosión con invasión masiva de larvas y ninfas de garrapatas. En zonas de clima moderado, el desarrollo de las diferentes fases se inhibe considerablemente en invierno. Sin embargo, se dan casos de hipobiosis, (la interrupción temporal del desarrollo de un parásito) de modo que el ciclo evolutivo completo puede durar de uno

a dos años con tipos de vegetación de pastizal y arbustos densos (Hugh-Jones 1991; Quiroz, 1993; Horak *et al.*,1995).

Una vez que la hembra adulta completa su ciclo, pone sus huevos en sitios húmedos, frescos y libres de la radiación solar, de preferencia en la parte baja de la vegetación predominante, con ella asegura una eclosión alta. Una vez, que emergen las larvas, durante el día se protegen contra la desecación del sol, cuyo refugio es la sombra de los pastizales o de otros vegetales, incluso debajo del suelo (Falk-Vairant *et al.*, 1994).

La temperatura disminuye el umbral de la postura de huevos en un rango que va de 15°C a 37°C. La supervivencia de las hembras sin comer depende de la temperatura y edad fisiológica. Las garrapatas adultas son más susceptibles a las altas temperaturas que las jóvenes, ya que la cutícula en las adultas es más permeable. Por su parte, la temperatura modula el índice del estado de letargo y los efectos de muda (Bittencourt, 1995).

Ciclo biológico *R. microplus*

El ciclo biológico de la garrapata *R. microplus* ocurre entre el hospedero, la vegetación y el suelo de un sitio específico; comprende cuatro estados biológicos: el de huevo (incuba 17 a 21 días), larva (7 a 10 días), ninfa (5 a 6 días) y adulto (1 a 3 días); de una fase a otra se lleva a cabo el proceso de ecdisis o desprendimiento del exoesqueleto; la fase parásita, se inicia en el suelo (larva), luego trepa a las plantas más cercanas y más tarde al hospedero animal; tanto en los animales como en el suelo, la garrapata está expuesta a cambios de temperatura y humedad ambiental (Kaufman y Lomas, 1996).

La hembra adulta se aleja del hospedero una vez que realiza la cópula y se repleta de sangre. La hembra oviposita de 2,000 a 5,000 huevos (Guo *et al.*,1998). La

incubación de los huevos ocurre de 17 a 21 días si son favorables las condiciones ambientales, con una temperatura de 20.6°C y un 80% de humedad relativa (Cupp, 1991; Kaufman y Lomas, 1996). Si las condiciones le favorecen, la garrapata puede completar su ciclo de vida en 37 días, pero en la adversidad puede hacerlo hasta los 281 días según el medio que se encuentre (Cupp, 1991; Garris, 1991).

Métodos de control

La tendencia es buscar alternativas que permitan mantener el control de las garrapatas y se basa principalmente en el uso de ixodicidas; sin embargo, su uso irracional ha propiciado la aparición de garrapatas resistentes a las principales familias de ixodicidas, reportándose poblaciones de garrapatas resistentes a organoclorados, organofosforados, piretroides (NOM-EM-004-ZOO/1994) y amidinas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006ab ; 2007). Acosta y Alonso (2010) mencionan los siguientes factores de riesgo asociados a la resistencia: a) el uso rutinario e indiscriminado (más de 6 aplicaciones por año) del mismo producto, b) el mal uso de los mismos (mala dosificación ó uso de mezclas caseras), c) la raza de los animales (genéticos y biológicos), d) la falta de mantenimiento del equipo (limpieza del baño de inmersión, el monitoreo del pH cuando se utilizan amidinas, etc).

Por la demanda de alimentos libres de residuos químicos y por el cuidado del ambiente, se sugiere la utilización de sistemas alternativos de control de garrapata, entre los que se pueden contar el empleo de nematodos (Hill, 1998), vacunas (Jonsson *et al.*, 2000), bacterias (Hassanain *et al.*, 1997), aceites esenciales (Prates *et al.*, 1998) y hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* (*B. bassiana*) y *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae*) (López *et al.*, 2009). Se tiene reportado que estos hongos causan mortalidad en garrapatas adultas, a la vez que disminuyen su fecundidad (Kaaya y Hassan, 2000; Benjamín *et al.*, 2002; Da Costa *et al.*, 2002).

Control biológico

El término control biológico fue usado por primera vez por Smith en 1919, para referirse al uso de enemigos naturales en el control de insectos plaga. Su alcance se ha extendido con el tiempo, a tal grado que ahora se presentan problemas para definirlo adecuadamente, en particular, porque el término implica aspectos académicos y aplicados (Eilenberg *et al.*, 2001). El control biológico es una de las herramientas importantes para la prevención de enfermedades debidas a agentes tóxicos en el medio ambiente general o en el medio ambiente de trabajo. El control biológico es típicamente definido como el proceso mediante el cual se controlan plagas no nativas con especies nativas o importadas, frecuentemente antagonistas del lugar de origen de la plaga (Myers *et al.*, 1994; Simberloff y Stiling, 1996). El término “control biológico neoclásico” es cuando se introduce un antagonista de una especie nativa (Simberloff y Stiling, 1996).

Ventajas: El control biológico posee muchas ventajas, poco o ningún efecto nocivo colateral, elimina sustancialmente el uso de insecticidas, no provoca intoxicación y evita plagas secundarias, del mismo modo la relación costo beneficio es favorable (Barrera, 2007).

Éxito: El éxito en control biológico es difícil de medir; sin embargo, desde el punto de vista ecológico, alguna clase de éxito se presenta cuando una especie introducida se establece por sí misma (Hokkanen, 1985).

Riesgo: Frecuentemente se declara que la introducción de agentes de control biológico es ambientalmente segura y sin riesgos. Sin embargo, existen evidencias que indican que esta aseveración no es del todo cierta. Aunque este tema no es nuevo, los debates sobre los riesgos del control biológico continúan con mayor intensidad (Louda *et al.*, 2003).

Actualmente se reconoce que algún grado de riesgo acompaña a los programas de control biológico como en cualquier otra estrategia de control. Por lo tanto, a fin de reducir el daño inherente a la introducción de enemigos naturales, se deben seguir procedimientos científicos probados (Howarth, 1991).

Hongos entomopatógenos

Las investigaciones con hongos entomopatógenos cada día reciben más atención debido a los efectos permanentes que causan en poblaciones de insectos plaga de importancia económica y por el uso potencial como agente de control biológico en programas de manejo integrado (Samish y Rehacek, 1999). Constituyen un grupo con más de 750 especies que al dispersarse en el ambiente provocan infecciones fúngicas a las poblaciones de insectos (Pucheta *et al.*, 2006), entre los géneros más importantes están: *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., *Cordyceps bassiana* (= *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.), *Erynia*, *Eryniopsis*, *Aschersonia*, *Akanthomyces* e *Isaria fumosorosea* (= *P. fumosoroseus* (Wise) (Monzón, 2001).

Taxonomía de los hongos entomopatógenos

Según la clasificación taxonómica hecha por Ainsworth (1973), la cual separa el reino Fungi en dos divisiones Myxomycota y Eumycota, formas no plasmidiales y que son frecuentemente miceliales; por décadas la taxa considera a los entomopatógenos en la división Eumycota dentro de la subdivisión Deuteromycotina, Clase Ascomycetes y orden moniliales. Su reproducción es asexual por medio de conidias, común en los Deuteromycotina (Tanada y Kaya, 1993).

Características de los hongos entomopatógenos

Los hongos poseen ciertas características por las que se les utiliza para el control biológico, entre ellas cuentan con cierto grado de especificidad (capacidad para

detectar a individuos sanos) (Tanada y Kaya, 1993). La habilidad de penetrar al insecto hospedero (Hogsette, 1999), puede dispersarse y si sobreviven a las nuevas condiciones se pueden establecer en la región en que fueron introducidos, poseen alta especificidad, persistencia en el medio ambiente bajo condiciones adecuadas, compatibilidad con insecticidas y con otros entomopatógenos, inocuidad ambiental; además son fáciles de manipular, se pueden reproducir masivamente y algunas formulaciones ya se venden comercialmente (France *et al.*, 1999; Devotto *et al.*, 2003).

La seguridad es un factor importante que se debe considerar en el desarrollo y uso de hongos entomopatógenos para el control de plagas; en tanto, se requiere la realización de pruebas con animales, para evaluar los posibles riesgos de salud en el hombre y la fauna (domésticos y silvestres) (Zimmermann, 1993; Jevanand y Kannan, 1995; Torriello *et al.*, 2006).

Los hongos entomopatógenos han sido aplicados por diferentes métodos (inyección, inhalación, aspersión, exposición ocular, termal y alimenticia) en animales vertebrados tales como: aves, ratas, ratones, conejos y reptiles. No se han observado síntomas patológicos y toxicológicos hasta la fecha, no obstante lo anterior, los entomopatógenos raramente han sido aislados de humanos u otros animales; sin embargo, pocos casos de micosis en humanos y animales han sido reportados (Muir *et al.*, 1998; Revankar *et al.*, 1999). Las exposiciones crónicas y la inhalación a altas cantidades de conidias, durante la producción masiva y la aplicación de hongos imperfectos para el control biológico, puede guiar a la sensibilidad que desencadena alergias (Ward *et al.*, 2000).

En vista al bajo número de reportes de casos en humanos por infección de estos hongos, en los últimos cien años, el riesgo es extremadamente bajo, estos mismos no tiene peligro alguno y pueden ser seguros para el hombre, animales y/o plantas (Torriello *et al.*, 2006). Del mismo modo no tiene efecto maligno o adverso en insectos benéficos (James y Lighthart, 1994).

Existen ciertas limitaciones en su uso; dentro de los factores ambientales algunos les son desfavorables, son sensibles a temperaturas extremas superiores 36°C (Fargues *et al.*, 1992; Polar *et al.*, 2005), a la desecación y a la luz ultravioleta (Magalhaes y Boucias, 2004; Rangel *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006). El almacenamiento de las unidades infectivas requiere condiciones mucho más exigentes, en comparación a moléculas inorgánicas. La velocidad de acción controladora que presentan es menor a la de los productos químicos, ya que no matan instantáneamente al insecto plaga (Devotto *et al.*, 2003).

Mecanismo de acción patogénica de los hongos entomopatógenos

La unidad infectiva de todos los hongos entomopatógenos es una espora, usualmente un conidio, el desarrollo de micosis está dividido en las siguientes fases:

A) Adherencia de la espora con el hospedero: el contacto de la espora con la superficie del hospedero es por la cutícula, con uno o varios conidios, las características físicas y químicas de la superficie de la cutícula del insecto y la espora son las responsables de esta unión (Jones, 1994; Pucheta *et al.*, 2006).

B) Germinación de la espora: este proceso depende de las condiciones del medio ambiente si son óptimas la temperatura y humedad (27 ± 2 °C, HR 90 ± 5 %) y en menor grado las condiciones de luz y nutricionales, esta espora germina y da origen a un tubo germinativo que penetra directamente a la cutícula o produce unas células apresoras que la dan una característica de mayor adherencia sobre el integumento del insecto (Khachatourians, 1996; Pucheta *et al.*, 2006).

C) Penetración del integumento: la penetración de la cutícula del insecto por conidias germinadas ocurre como resultado de una combinación entre la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica por el tubo germinal, donde

normalmente crecen en forma de levaduras llamadas cuerpos hifales o blastosporas, se produce un tubo germinativo y un apresorio, éste se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto, la penetración depende de las propiedades de la cutícula, grosor, esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales (Vestergaard *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2005; Pucheta *et al.*, 2006).

D) Penetración a través de cuerpos abiertos: los hongos pueden infectar insectos a través de la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas de un insecto, la humedad no es un problema en el tracto alimenticio, la espora puede germinar rápido en este ambiente, los fluidos digestivos pueden destruir la espora o la hifa germinativa, la digestión de estructuras fúngicas puede causar la muerte por toxicidad más que por micosis. En condiciones secas los hongos pueden permanecer en latencia dentro del cuerpo de su hospedero por periodos largos de tiempo y bajo condiciones óptimas de temperatura y humedad se estimula y germina para salir al exterior y producir conidias (Pucheta *et al.*, 2006; Tellez-Jurado *et al.*, 2009).

E) Replicación en el hemocele: después de llegar al hemocele, convierten el crecimiento micelial en una fase de levadura o sea crecimiento por gemación, se producen toxinas y enzimas, aunque algunos hongos aparentemente no poseen toxinas, matan el insecto al consumir todos los nutrientes o por física destrucción, las toxinas causan la muerte del insecto debido a la degeneración de los tejidos, pérdida de la integridad estructural de las membranas seguido de la deshidratación de las células por pérdida de fluido (Giménez-Peccia *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2003). Si la disponibilidad de agua es alta los hongos emergen al exterior a través de la cutícula y esporulan sobre el cadáver produciendo inóculo para infectar a otros insectos; si las condiciones no son favorables, queda dentro del cadáver del insecto, donde puede sobrevivir por algunos meses y eventualmente producirá esporas cuando las condiciones sean favorables (Vey *et al.*, 2002; Pucheta *et al.*, 2006).

F) Dispersión de las esporas: puede ser un proceso activo o pasivo y depende de las características de la spora y el esporangio, cada conidia puede adherirse o pasar de un invertebrado a otro por dispersión (Robinson, 1966; Smith *et al.*, 2000; Pucheta *et al.*, 2006).

Toxinas Entomopatógenas

Los hongos entomopatógenos en algunas de sus especies, pueden matar al hospedero mediante la acción tóxica, más que por la invasión del mismo a través del cuerpo del insecto, estas sustancias son metabolitos secundarios considerados como compuestos tóxicos a insectos; cuando los hongos patógenos logran el total reconocimiento de su hospedero, estos germinan y penetran la cutícula del insecto, para alcanzar el homocelo, sufren el ataque de las defensas por parte del hospedero, una del tipo químico, donde la unidad infectiva se ve deteriorada por una reacción de oxidación por los compuestos fenólicos que da como resultado la formación de una capa melanizada alrededor de los sitios de infección y otra de tipo mecánico (Pucheta *et al.*, 2006).

El efecto de las toxinas en la hemolinfa de los insectos, es la reducción de los movimientos de los componentes de la misma lo que impide una rápida formación de granulosis y permite la multiplicación del hongo dentro del homocelo (caso típico para las destruxinas), la parálisis al insecto pueden ser causadas por las citocalcinas. Los hongos entomopatógenos (HE) poseen la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en el ciclo de las relaciones patógeno-hospedero; las toxinas (dextruxinas, demetildestruxina y protodextruxina) son de suma importancia ya que se pueden sintetizar productos químicos de baja toxicidad y de elevada acción insecticida, acariciada y nematocida. Es posible también seleccionar aislamientos de HE altamente toxicogénicos que se encuentran en forma natural o bien ser mejoradas genéticamente con relación a ese aspecto (Ferron, 1985; Pucheta, 2006).

Ambiente-hongos entomopatógenos

Los factores ambientales cumplen una función esencial en la iniciación y desarrollo o en la prevención y supresión de las epizootias naturales afectando las condiciones fisiológicas del hospedante, su densidad y distribución espacial y temporal. Ellos forman un complejo de factores que interactúan entre sí y entre los otros componentes del ambiente, siendo los más estudiados la temperatura y humedad relativa (Lecuona, 1996; Hajek, 1997; Pucheta *et al.*, 2006).

Temperatura: la temperatura puede afectar la estabilidad de los patógenos en el almacenamiento, durante las aplicaciones en el campo y en su ocurrencia natural en el agroecosistema. Como los HE no poseen condiciones biológicas para defenderse de las graves variaciones de temperatura, este factor puede ser, muchas veces, limitante para varios microorganismos. De modo general, la baja favorable de temperatura para los diferentes grupos de entomopatógenos varía entre 20 y 30 °C. Sin embargo, existe una temperatura ideal para cada patógeno y para cada fase del ciclo de las relaciones entre este y los hospedantes. La temperatura es uno de los factores abióticos más importantes para los HE, ya que puede afectar la germinación de las esporas, el desenvolvimiento y penetración del tubo germinativo y la colonización y reproducción. Las exigencias térmicas de los hongos son variables en función de la especie, cepa y fase del desarrollo. El desarrollo de la enfermedad fúngica en los insectos puede ser perjudicado por temperaturas superiores a 30°C (Lecuona, 1996; Hajek, 1997; Pucheta *et al.*, 2006).

Humedad relativa y precipitación: la humedad relativa es un factor de gran importancia, tanto para el hospedante como para el patógeno. Ella es necesaria para las diferentes fases del ciclo de las relaciones entre ambos organismos. Así, ella actúa sobre la germinación, penetración y es indispensable para la reproducción de los HE. Por otro lado, mientras que la temperatura afecta la velocidad del proceso de la

enfermedad, la falta de humedad adecuada puede perjudicar a una epizootia. En relación con los hongos, se ha observado que a medida que la humedad relativa disminuye, puede aumentar la temperatura media letal para los conidios. En general varios patógenos no toleran humedades elevadas durante la fase de almacenamiento. La forma y el momento de liberación de los inóculos al medio pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad a campo, estando influenciados por factores climáticos como la humedad relativa y la luz (Lecuona, 1996; Hajek, 1997; Pucheta *et al.*, 2006).

Radiación solar y fotoperiodo: la sensibilidad de los patógenos a la radiación ultravioleta puede variar en función de la especie y cepa del patógeno. Muchos estudios indican que los HE presentan gran sensibilidad a la radiación solar. En líneas generales, el fotoperiodo no constituye un factor limitante para la producción de HE (Lecuona, 1996; Hajek, 1997; Pucheta *et al.*, 2006).

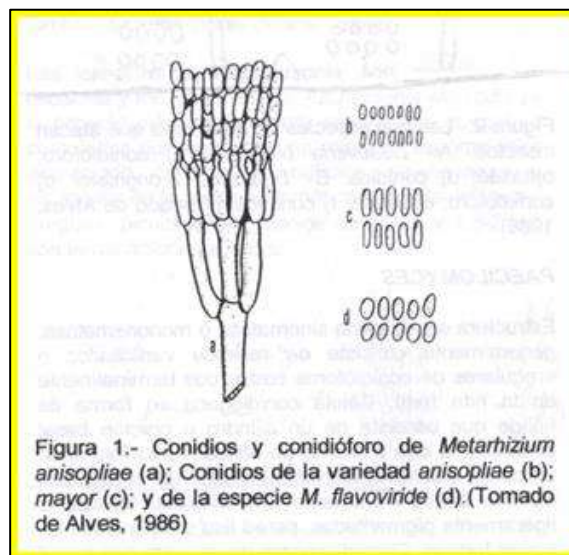
Agroquímicos: la susceptibilidad de los HE a los agroquímicos puede variar de acuerdo con el grupo y cepa del patógeno, con la naturaleza química del producto y con la dosis empleada. Existen sustancias que son letales para los microorganismos, otras poseen efecto fúngico o bacteriostático y finalmente productos a dosis normales y/o sub-letales pueden favorecer su crecimiento, reproducción y virulencia (Lecuona, 1996).

Géneros más importantes

***Metharizium anisopliae* (Metsch.) Sor**

Es un hongo deuteromiceto, patógeno generalista forma conidióforos simples o agregados, posee conidias alargadas, ovoides o cilíndricas dispuestas en cadenas, originadas de conidióforos en forma de botella; las conidias miden de 6 a 8 micras, son verde olivo, por lo que la enfermedad de los insectos se denomina “muscardina verde” en todo el cadáver del insecto (Figura 1). Este hongo es considerado cosmopolita, pues

se reporta en distintos lugares del mundo (Samson, 1981). El primer trabajo de control microbiano con *Metharizium anisopliae* fue realizado por Metschnikoff en 1879. El ciclo total de la enfermedad es de 10 días, tiempo necesario para la germinación, penetración, colonización y esporulación en insectos. En algunas ocasiones no se presenta la esporulación sobre el tegumento, solamente se ve la presencia de micelio y se debe a condiciones inadecuadas de humedad durante el proceso de esporulación (Lecuona, 1996). Este hongo invade el cuerpo del artrópodo hospedero a través de la cutícula y posteriormente se reproduce en él, favoreciendo así la transmisión horizontal del hongo y además puede tener efecto sobre la reproducción del organismo que está siendo atacado (Quesada *et al.*, 2004). *M. anisopliae* ha sido utilizado comúnmente para el control de insectos entre los que se destacan hormigas, termitas, langostas y cucarachas entre otros, y también se ha usado para el control de ácaros y garrapatas (Souza *et al.*, 1999; Bittencourt, 2000; Kaaya y Asan, 2000; López y Orduz, 2003; López *et al.*, 2009).



El hongo *Paecilomyces fumosoroseus*, deuteromiceto, es un patógeno de amplio intervalo de hospederos y gran distribución geográfica, que ha sido aislado del suelo y

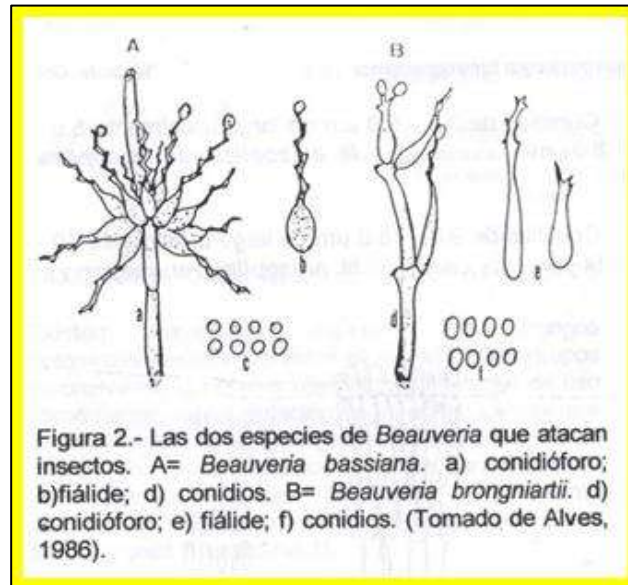
de insectos de diversos órdenes como homópteros, coleópteros y colémbolos. La patogenicidad de este hongo y su uso potencial como biocontrolador está documentado (Osborne y Landa, 1992; Pozo y Rodríguez, 2003, Chan *et al.*, 2010).

***Cordyceps bassiana* (=Beauveria bassiana) (Bals.) Vuill**

El género *Cordyceps* es un entomopatógeno imperfecto, sus hifas septadas contienen las estructuras reproductivas denominadas conidióforos, sobre las cuales se desarrollan las conidias (Tanada y Kaya, 1993). *Cordyceps bassiana* (=Beauveria bassiana) ramifica su micelio para formar los conidióforos que son simples e irregulares las cuales terminan en vértices en formas de racimos. Este mismo hongo se caracteriza por presentar un micelio blanco, conidióforos sencillos, irregularmente agrupados o en grupos verticilados, en algunas especies hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene la conidia, la cual se presenta en forma de zig-zag (Humber, 1992). Después de que varias conidias se producen, son hialinas, redondeadas a ovoides y unicelulares (Bustillo, 2001). *B. bassiana* posee conidias de globosas a subglobosas (2-3 x 2.0-2.5 µm) y las estructuras conidióforas forman densos grupos (Figura 2) (Samson *et al.*, 1988). En medio de cultivo alcanza su desarrollo completo en 21 días a 27°C. *B. bassiana* es parásito facultativo, el cual posee conidias que constituyen la unidad infectiva del hongo. El proceso infectivo que lleva al insecto atacado por el hongo a morir se cumple en tres etapas: La primera de germinación de esporas y penetración de hifas al cuerpo del hospedero dura de 3 a 4 días. La penetración del hongo al hospedero ocurre a través de la cutícula o por vía oral.

La razón para dicha preferencia reside en su amplio rango de acción correspondiente a cerca de 750 especies de insectos, el alto grado de conocimiento a nivel molecular de la interacción hospedero-patógeno y el desarrollo del sistema de producción de este hongo (Feng *et al.*, 1994; Inglis *et al.*, 2001; Khachatourians *et al.*, 2002; Uribe y Khachatourians, 2007). En Brasil obtuvieron de 20 a 50% de mortalidad a

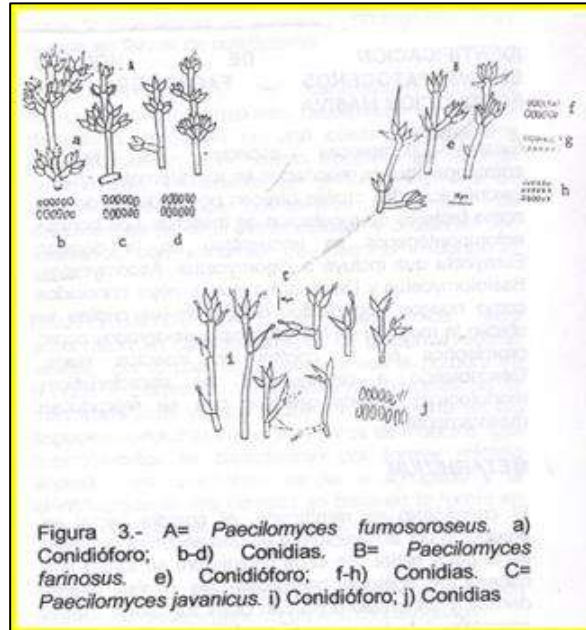
los siete días de la inoculación de *Beauveria bassiana* en *R. microplus* (Campos et al., 2010).



***Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (Wise)**

El género *Isaria* presenta hifas hialinas a amarillosas, septadas y con paredes lisas. La estructura conidiógena es un sinema o monosinema que consiste de hifas compactadas presentando ramificaciones verticiladas o irregularmente ramificadas, llevan en su parte terminal en cada rama grupos de fiálides, las cuales pueden ser también solitarias. Las fiálides constan una porción basal cilíndrica o hinchada, adelgazándose abruptamente a menudo para formar un cuello muy notorio. Los conidióforos llevan cadenas de conidias en racimos secos los cuales son fácilmente dispersados por el viento originando la infección de huéspedes sanos (Fransen, 1990). Estas son hialinas, unicelulares y de forma ovoide (Figura 3) (Bustillo, 2001). *Isaria* es un patógeno con amplio espectro de huéspedes y ha sido aislado de insectos de

diversas Familias de los Ordenes Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Neuroptera, Hymenoptera, Hemiptera y Homoptera en diferentes partes del mundo (Humber, 1992).



Por lo anterior, una alternativa para el control de garrapatas es el uso de hongos entomopatógenos y la mezcla de ellos. Marchiondo *et al.* (2007) mencionan que debido a estas características, se han realizado estudios para evaluar su eficacia (respuesta terapéutica producida por un producto en contra de un ectoparásito) y la persistencia de la eficacia (permanencia de la actividad terapéutica de un producto medida en días o semanas después del día de tratamiento para el control de garrapatas). El control biológico es una buena alternativa, los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Metarhizium anisopliae* han sido los más utilizados.

Sin embargo, existen pocos estudios sobre el control de garrapatas, aunque se sabe que 17 especies de hongos fueron probados en ellas (Samish y Rehacek, 1999).

OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficacia de los hongos entomopatógenos en el control biológico de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Michoacán.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Comparar, *in vitro*, los porcentajes de eclosión de huevos de garrapatas *R. microplus* infectados con diferentes combinaciones de hongos de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus*.
2. Comparar, *in vitro*, los porcentajes de mortalidad de garrapatas (*R. microplus*) infectadas con diferentes combinaciones de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus*.
3. Evaluar, *in vivo*, la eficacia de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. en el control biológico de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en ganado bovino de tres municipios de Michoacán.

HIPOTESIS

1. Las cepas de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* controlan las poblaciones de huevos y adultos de garrapatas (*R. microplus* y *A. cajennense*) *in vitro*.
2. Las cepas de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* controlan las poblaciones de garrapatas (*R. microplus*) *in vitro* en Michoacán.
3. Al menos una especie de hongo entomopatógeno controla las poblaciones de garrapatas por arriba del 90% de efectividad.

BIBLIOGRAFIA

- Acosta R M R y Alonso D M A. 2010. La biotecnología aplicada al control de garrapata. Memorias del XVII Día del Ganadero. Agroentorno. [www.http: funprover.org/agroentorno/ene010/biotecn.pdf](http://www.funprover.org/agroentorno/ene010/biotecn.pdf)
- Ainsworth G C. 1973. Introduction and keys to higher taxa. In "The fungi: A natural history". G C Ainsworth., F K Sparrow and A S Sussman, eds. Academic Press, New York. Vol. IVA. p.1-7.
- Barrera J F. 2007. Introducción, filosofía y alcance del control biológico. En: Rodríguez del Bosque L A y Arredondo-Bernal H. (eds.). Teoría y aplicación del control biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. México. p.1-18.
- Benjamín M., Zhioua E. y Ostfeld R. 2002. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol. 5: 723-728.
- Bittencourt V E R P. 2000. Trials to control south american ticks with entomopathogenic fungi. Annals of the New York Academy of Sciences. 916: 555-558.
- Bittencourt V E R P., Massard C L., Lima A F. 1995. Infection dynamics of the tick *Boophilus microplus* by the fungus *Metarhizium anisopliae*. Rev Univer Rur Serv; Cien Vida. 16:49-55.
- Borchert A. 1981. Parasitología Veterinaria. (3ª ed.). Edit. Acribia. Zaragoza, España. p. 433-441.
- Bustillo A. 2001. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: Seminario Uso de Entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá, Col. p.30-53.
- Cabrera J D. 2003. Identificación Taxonómica de Garrapatas Ixodidas (Acari: Ixodidae). (Tesis de Licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Campos R A., Boldo J T., Pimentel I C., Dalfovo V., Araújo W L., Azevedo J L., Vainstein M H. y Barros N M. 2010. Endophytic and entomopathogenic strains of

- Beauveria* sp to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Genet Mol Res. 9 (3): 1421-1430.
- Castellanos H J L. 1993. Importancia sanitaria y económica de las garrapatas. En: Programa de acreditación de MVZ: Campaña contra la garrapata. Normas y Procedimientos. SARH, CNMVZM, México, D.F. p.36-45.
- Cordero del Campillo M., Rojo V F A., Quiroz R H., Martínez F A R., Sánchez A C., Navarrete L I. y Díez B P. 1999. Parasitología Veterinaria. Edit. Mc Graw Hill. Interamericana. p.420-460.
- Cupp E W. 1991. Biology of ticks. Vet Clin N Am. 21 (1):1-26.
- Chan C W., Ruiz S E., Cristóbal A J., Pérez G A., Munguía R R. y Lara R.J. 2010. Desarrollo *in vitro* de cuatro cepas nativas de *Paecilomyces fumosoroseus* y su patogenicidad en estados inmaduros de mosquita blanca. Rev. Agro. 5: 587-597.
- Da Costa G., Sarquis M., De Moraes A. y Bittencourt V. 2002. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887); in Rio de Janeiro State, Brazil. Mycopathol. 4: 207-209.
- Davey R B., Ahrens E H., George J E. 1997. Comparative Effectiveness of Coumaphos treatments applied by different methods for the control of *Boophilus microplus* (ACARI, IXODIDAE). J Agric Vet Sc. 148 (11):853-860.
- Devotto L., Gerding M., France A. 2003. Hongos entomopatógenos. (On line).www.inia.cl/cobertura/quilamapu/bioleche/BOLETIN23.html
- Eilenberg J., Hajek A., Lomer C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. Biocontrol. 46:387-400.
- Evans O G. 1992. Principles of Acarology. CAB International. University Press, Cambridge UK. p. 384-390.
- Falk-Vairant J., Guerin P M., Bruyne M y Rohrer M. 1994. Some observations on mating y fertilization in the cattle tick *Boophilus microplus*. Med Vet Entomol. 8:101-103.
- FAO. 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. <http://www.fao.org/americas/perspectivas/ganaderia/es/>

- FAO. 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Población bovina mundial. <http://www.rlc.fao.org/es/prioridades/transfron/eeb/pobo.htm>
- Fargues J., Maniania N K., Delmas J C., Smit N. 1992. Influence de la temperature sur la croissance *in vitro* Hyphomycetes entomopathogenes. Agronomic. 12: 557-564:
- Fernandes E K K., Costa L G., Morales L M A., Zahner V., Bittencourt V R E P. 2006. Study on morphology pathogenicity and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. Parasitol Res. 98:324-332.
- Feng M G., Poprawski T J. y Khachatourians G G. 1994. Production formulation application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control worldwide. Biocontrol Sci Techn. 4: 3-34.
- Ferron P. 1985. Fungal control. In: Comprehensi Insect Physiology and Pharmacology Ed.G.A. Kerkut and L.I. Gilbert. Pergamosn Press. 2:313-346.
- France A., Gerding M., Sandoval A., Espinoza S., Vivanco E. 1999. Patología de insectos. Chillán INIA Quilamapu. (Serie Quilamapu N°122). p.119.
- Fransen J J. 1990. Natural enemies of whitefly:fungi. In Gerling, D. Ed. Whiteflies: their bionomics, pest status and management. Andover, UK. Intercept. p.187-210.
- Garris G I. 1991. Control of Ticks. Vet Clin N Am. 21:173-183.
- Giménez-Peccia., Bogo M P., Santi M R., Morales L., Correa C K.,Vainstein C T., Schrank M H A. 2002. Characterization of mycoviruses and analices of chitinase secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. Current Microbiol. 45: 334-339.
- González G J J. 2006. Evaluación de técnicas para determinar el grado de infestación de garrapatas en potreros del municipio de Tiquicheo en la Región de Tierra Caliente, Michoacán. (Tesis de Licenciatura).Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Guo X., Xu Q., Harmon M A., Jin X., Laudet V., Mangelsdorf D., Palmer M J. 1998. Isolation of two functional retinoid x receptor subtypes from the idodid tick, *Amblyomma americanum* (L.). Mol Cell Endoc. 139:45-60.

- Guzmán-Cornejo C. y Robbins R G. 2010. The genus *Ixodes* (Acari: Ixodidae) in Mexico: adult identification keys, diagnoses, hosts, and distribution. *Rev Mex Bio.* 81: 289-298
- Guzmán-Cornejo C., Robbins R G. y Pérez T M. 2007. The *Ixodes* (Acari: Ixodidae) of Mexico: paratite-host and host-parasite checklists. *Zootaxa.* 1553:43-58.
- Hajek A E. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Adv Microb Ecol.* 15: 193-249.
- Hassanain M., El-Garby M., Abdel-Ghaffar F., El-Sharaby A. y Abdel-Meged K. 1997. Biological control studies of soft and hard ticks in Egypt. The effect of *Bacillus thuringiensis* varieties of soft and hard tick (Ixodidae). *Parasitol Res.* 3:209-213.
- Hill E. 1998. Entomopathogenic nematodes as control agents of development stages of the black legged tick: *Ixodes scapularis*. *J Parasitol.* 6:1124-1127.
- Hogsette J A. 1999. Management of ectoparasites with biological control organisms. *Int J Parasitol.* 29:147-151.
- Hokkanen H M T. 1985. Success in classical biological control. *CRC Critical Rev Plant Sci.* 3:35-72.
- Horak I G., Fourie L J., Vanzyl J M. 1995. Arthropod parasites of impalas in the Kruger National Park with Particular Reference to Ticks. *S Afr J Wildl Res.* 55: 337-342.
- Hoskins J D. 1991. Ixodid and argasid ticks, keys to their identification, in the veterinary clinics of North America, *Small Animal Practice.* Ed. Hoskins. p. 21-30.
- Hostis L M. y Seegers H. 2002. Tick-borne parasitic diseases in cattle: Current knowledge and prospective risk analysis related to the ongoing evolution in french cattle farming systems. *Vet Res.* 33: 599-611.
- Howarth F G. 1991. Environmental impacts of classical biological control. *Annual Rev Entomol.* 36:485-509.
- Hugh-Jones M. 1991. The remote recognition of ticks habitats. *J Agr Entomol.* 8(4): 309-315.
- Humber A R. 1992. Collection of Entomopatogenic fungal cultures: Catalog of Strains. U.S. Department of Agricultural. Research Service. ARS. p.110-117.

- INEGI. 2007. Instituto Nacional de Estadística y Geográfica. Censo Agropecuario. Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007. Tabulado_Mpio_VIII_CAGyF_30_16 (ExcelMicrosoft).<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/tabuladosbasicos/default.aspx?c=17177&s=est>.
- Inglis D G., Goettel S M. y Butt M T. y Strasser H. 2001. Use of hypomycetous fungi for managing insect pests, p. 23-69. En: Butt T. M., Jackson C., Magan N. (eds.). Fungi as biocontrol agents. CAB International. Wallingford.
- James R R y Lighthart B. 1994. Susceptibility of the convergent lady beetle to four entomopathogenic fungi. *Environ Entomol.* 23: 188-190.
- Jevanand H R., Kannan N. 1995. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* as a biocontrol agent for coconut pest *Oryctes rhinoceros* and its mammalian toxicity test on rats. *J Ecotox Environ Monitor.* 5:51-57.
- Jones R L. 1994. Role of field studies in assessing environmental behavior of herbicides. Proc. Brighton crop protection conference. Weeds. Brighton, RU. 3: 1275-1282.
- Jonsson N N. 1997. Control of cattle ticks (*Boophilus microplus*) on Queensland dairy farms. *Aust Vet J.* 11: 802-807.
- Jonsson N N., Matschoss A., Pepper P., Green P., Albrecht M., Hungerford J. y Ansell J. 2000. Evaluation of tickGARD Plus; a novel vaccine against *Boophilus microplus*; in lactating Holstein-Friesian cows. *Vet Parasitol.* 3: 275-285.
- Kaaya G P. y Hassan S. 2000. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Exp Appl Acarol.* 12: 913-926.
- Kaufman W R y Lomas L O. 1996. Male factors in ticks-their role in feeding y Egg development. *Invert Reprod Develop.* 30:191-198.
- Khachatourians G G. 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In Howard DH, Miller JD. *The Mycota VI. Human and Animal relationship.* Springer Berlín Alemania. p.331-364.
- Khachatourians G G., Valencia E. y Miranpuri G S. 2002. *Beauveria bassiana* and other entomopathogenic fungi in the management of insect pests. p. 239-275. En: Koul,

- O., Dhaliwal, G.S. (eds.). Microbial Biopesticides. Vol. 2. Reading, United Kingdom: Harwood Academic Publishers.
- Lecuona R E. 1996. Control Microbiano. Perspectiva del empleo de hongos entomopatógenos en Argentina. Congreso de Micología. Rosario, Argentina. p.47.
- Lindquist E E., Krantz G W. y Walter D E. 2009. A Manual of Acarology. 3rd ed. Texas Tech University Press, Lubbock, TX, USA. p.807.
- López E. y Orduz S. 2003. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control nests of the fungus-growing ant; *Atta cephalotes*. Biol Control. 27(2): 194-200.
- López E., López G. y Orduz S. 2009. Control of the cattle tick *Boophilus microplus* with *Metarhizium anisopliae*, laboratory and field studies. Rev Col Entomol. 1: 42-46.
- Louda S M., Pemberton M T., Follet P A. 2003. Nontarget effects the Achilles heel of biological control retrospective analyses to reduce risk associated with biocontrol introductions. Annual Rev Entomol. 48:365-396.
- Magalhaes B P., Boucias D G. 2004. Effects of drying on the survival of conidiospores of *Metarhizium anisopliae* var. *acridium* Driver y Milner. J Orthoptera Res. (13):155-159.
- Marchiondo A A., Holdsworth P A., Green P., Blagburn B L. y Jacobs D E. 2007. World Assoc Advancement Veter Parasitol (W.A.A.V.P.). Guidelines for evaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestation on dogs and cats. Vet Parasitol. 145:332-344.
- Minson D J. 1990. Forage in Ruminant Nutrition. New York. Academic Press. 1:2-7.
- Monzón. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integral de Plagas (Costa Rica). (63):95-103.
- Moraes C K., Schrank A., Vainstein M H. 2003. Regulation of extracellular chitinase and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. Current Microbiol. 46: 205-210.
- Muir D., Mertin P., Kendall K., Malik R. 1998. Invasive hyphomycotic rhinitis in a cat due to *Metarhizium anisopliae*. Med Mycol. 36:51-54.
- Munderloh U G y Timothy J K. 1995. Cellular and molecular interrelationship between ticks and prokaryotic tick-borne pathogens. Annual Rev Entomol. 40:221-243.

- Myers J H., Smith J N M., Elkinton J S. 1994. Biological control and refuge theory. *Scienc.* 22:265-811.
- NOM-EM-004-ZOO/1994. Norma Oficial Mexicana de Emergencia.05-19-95.Campaña Nacional contra la garrapata *Bhoophilus* spp. www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?
- Norval R A I., Sutherst R W., Jorgensen O G., Kerr J D. 1997. Role of Grooming in Biological Control of Ticks. *Entomol Med Vet.* 11:143-147.
- Ocádiz G.T. 1995. Epidemiología en los Animales Domésticos para el Control de Enfermedades. (2ª ed) Ed. Trillas. México, D.F. p.178-182.
- Ojeda-Chi M M., Rodriguez-Vivas R I., Galindo-Velasco E., Lezama-Gutiérrez R. y Cruz-Vázquez R. 2011. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso de hongo entomopatógeno *Metarhizium anisoplae* (Hipocreales: Clavicipitaceae). *Rev Mex Cienc Pecu.* 2: 77-192.
- Osborne L S. y Landa Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomol.* 4: 456-471.
- Polar P., Aquino De Muro M., Kairo M., Moore D., Pegram R., John S A., Roach-Benn C. 2005. Thermal characteristics of *Metarhizium anisoplae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. *Vet Parasitol.* 134:159-167.
- Pozo N M. y Rodríguez A D. 2003. Alternativa para el manejo de *Trialeurodes vaporariorum* Westwood en tomate orgánico en Uruguay. *Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas España.* 2: 211- 218.
- Prates H., Leite B R., Craveiro C A. y Oliveira D A. 1998. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). *J Braz Chemic Soc.* 2: 193-197.
- Pucheta D M., Flores M A., Rodríguez N S. y De la Torre M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *INCI.* 31: 12.
- Quesada M E., Santos Q R., Valverde G P. y Santiago A C. 2004. Virulence; horizontal transmission; and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisoplae*

- (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: *Blattellidae*). *J Invertebr Pathol.* 87 (1): 51-58.
- Quiroz R H. 1993. Importancia sanitaria y económica de las garrapatas. En: Programa de acreditación de MVZ: Campaña contra la garrapata. Normas y Procedimientos. SARH, CNMVZM, México, D.F. p.14-15.
- Rangel D E N., Braga G U L., Anderson A J., Roberts D W. 2005. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *J Invertebr Pathol.* 88:116-125.
- Revankar S G., Sutton D A., Sanche S E., Rao J., Zervos M., Dashti F., Rinald M G. 1999. *Metarhizium anisopliae* as a cause of sinusitis in immunocompetent hosts. *J Clinical Microbiol.* 37:195-198.
- Robinson R.K. 1966. Studies on penetration of insect integument by fungi. *Pans. B.* 12:131-142.
- Rodríguez-Vivas R I., Alonso-Díaz M A., Rodríguez-Arevalo F., Fragoso-Sánchez H., Santamaria V M. y Rosario-Cruz R. 2006a. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the state of Yucatan, México. *Vet Parasitol.*136:335–442.
- Rodríguez-Vivas R I., Rodríguez-Arevalo F., Alonso-Díaz M A., Fragoso-Sánchez H., Santamaria V M. y Rosario-Cruz R. 2006b. Amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms from the state of Yucatan, Mexico: prevalence and potential risk factors. *Prev Vet Med.* 75:280–286.
- Rodríguez-Vivas R I., Rivas A L., Chowell G., Fragoso S H., Rosario C R. y Garcia Z. 2007. Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico. *Vet Parasitol.* 146:158–169.
- Samish M. y Rehacek J. 1999. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annu.Rev.Entomol.* Disponible en:www.arjournals.annualreviews.org.

- Samson R A. 1981. Identification: entomopathogenic Deuteromycetes. In Burges, H.D. Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. London, H.D. (Ed.) Academic Press. p.93-106.
- Samson R A., Evans H., Latge J. 1988. "Atlas of Entomopathogenic Fungi". Springer-Verlag, Berlín. p.300.
- Silva R O., Silva H H G., Ulloa C J., Luz C. 2005. Is there a relationship between N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (Hyphomycetes) isolates from peridomestic areas in Central Brazil and larvicidal effect on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). JEN. 129: 158-164.
- Simberloff D., Stilin R W P. 1996. How risky is biological control? Ecol. 77:1965-1974.
- Smith K. E., Wall R., French N.P. 2000. The use of entomopathogenic fungi for the control of parasitic mites, *Psoroptes* spp. Vet. Parasitol. 92:97-105.
- Souza E., Reis R. y Bittencourt V. 1999. Evaluation of *in vitro* effect of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on eggs and larvae of *Amblyomma cajennense*. Rev Bras Parasitol Vet. 8 (2): 127-131.
- Tanada Y. y Kaya H.K. 1993. Insect Pathology. Academic Press. San Diego, California.(USA). p.666.
- Téllez–Jurado A., Cruz R M G., Mercado F Y., Asaff T A. y Arana–Cuenca A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. Rev Mex Mic. 30: 73-80.
- Torriello C., Pérez-Torres A., Burciaga-Díaz A., Navarro-Barranco H., Pérez-Mejía A., Lorenzo-Jiménez M., Mier T. 2006. Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of fan isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittlebugs. Ecotoxicol Environ Saf. 65:278-287.
- Uribe D. y Khachatourians G. 2007. Análisis y aplicaciones de la tipificación molecular del genoma mitocondrial de *Beauveria bassiana*. Rev Col Entomol. 33 (2): 89-97.
- Vargas M, Gordillo-Pérez G, Solórzano F, Rivera A, Polaco OJ, Muñoz O y Torres J (2007). Evidencias de *Borreliia burgdorferi* Sensu stricto en garrapatas del Noreste de México. Entomol Mex. 6(2):830-835.

- Vega A.C. y Murguía. 1993. Importancia sanitaria y económica de las garrapatas. En: Programa de acreditación de MVZ: Campaña contra la garrapata. Normas y Procedimientos. SARH, CNMVZM, México, D.F.p.61-62.
- Vestergaard S., Butt T M., Bresciani J., Gillespie A T., Elienberg J. 1999. Light and electron microscopy studies of the infection of the Western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera : Thripidae) by the entomopathogenic fungus *Metharizium anisopliae*. J Invert Pathol. (73): 25-33.
- Vey A., Matha V., Dumas C. 2002. Effects of the peptide mycotoxin destruxin on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. J Invert Pathol. (80):177-187.
- Ward M D., Madison S L., Sailstad D M., Gavett S H., Selgrade M K. 2000. Allergen-triggered airway hyperresponsiveness and lung pathology in mice sensitized with the biopesticide *Metarhizium anisopliae*. Toxic. (143):141-154.
- Zimmermann G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. Pest Scienc. (37):375-379.

RESULTADOS

ARTICULO I

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* Y *Paecilomyces fumosoroseus* EN HUEVOS Y ADULTOS DE GARRAPATAS (*R. microplus* y *A. cajennense*)

Elisa Valdez-Martínez¹, Ernestina Gutiérrez-Vázquez¹, Margarita Vargas-Sandoval², Aureliano Juárez-Caratachea¹, Guillermo Salas-Razo¹, Rogelio Garcidueñas Piña³. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo- ¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Carretera Morelia-Zinapécuaro km 9.5, Tarímbaro, Michoacán, CP 58880, México. ² Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Paseo Lázaro Cárdenas esq. Berlín s/n, Col. Viveros, Uruapan, Michoacán, CP 60170, México. ³Av. Acueducto Esq. Tzintzuntzan Col. Matamoros, Morelia, Michoacán 58130 México.

RESUMEN

Se evaluó la eficacia de cepas de *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* para el control de garrapatas *R. microplus* y *A. cajennense*. Se formaron grupos de 5 garrapatas adultas sometidas a Ma34, Ma198, Ma181, Ma14, Bb174 y Bb249 y grupos de 20 huevos de *R. microplus* con 4 repeticiones tratados con las cepas individualmente y sus mezclas (Ma198, Bb249, Pfr13, Bb249+Ma198, Pfr13+Ma198, Bb249+Pfr13 y Bb249+Ma198+Pfr13). Los resultados indican que los grupos de garrapatas adultas tratados con los seis tipos de cepas demuestran a Ma198 con un 80% de efectividad en *A. cajennense* y 100% en *R. microplus*. Los huevos de *R. microplus* sometidos a tratamientos mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) donde Ma198, Bb249+Ma198, Pfr13+Ma198 y Bb249+Pfr13+Ma198 mostraron una efectividad del 95 al 100%. Estos resultados demuestran que Ma198 se puede emplear como alternativa

para control biológico en adultos de *R. microplus* y *A. cajennense* y en huevos de *R. microplus*.

Palabras clave: Control biológico, garrapatas, hongos entomopatógenos

EVALUATION OF EFFICACY OF *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* AND *Paecilomyces fumosoroseus* IN EGGS AND ADULTS OF TICKS (*R. microplus* AND *A. cajennense*)

ABSTRACT

We evaluated the efficacy of strains of *M. anisopliae*, *B. bassiana* and *P. fumosoroseus* for controlling ticks *R. microplus* and *A. cajennense*. Five groups were formed under adult ticks Ma34, Ma198, Ma181, Ma14, BB174 and Bb249 and groups of 20 eggs of *R. microplus* treated with 4 replications strains alone and mixtures thereof (Ma198, Bb249, Bb249 + Ma198, Ma198 + Pfr13, Bb249 + Pfr13 and Bb249 + Ma198+ Pfr13). The results indicate that adult ticks groups treated with six different strains of Ma198 have 80% efficiency on *A. cajennense* and 100% on *R. microplus*. The eggs of *R. microplus* undergoing treatments showed significant differences ($P < 0.05$) where Ma198, Bb249 + Ma198, Pfr13 + Ma198 and Bb249+ Pfr13 + Ma198 with an efficacy of 95-100%. These results demonstrate that Ma198 alternatively can be used for biological control on adult of *R. microplus* and *A. cajennense* and eggs of *R. microplus*.

Keywords: Biological control, ticks, entomopathogenic fungi

INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (*R. microplus*) y *Amblyomma cajennense* (*A. cajennense*) son ectoparásitos que producen pérdidas en la ganadería bovina de las regiones tropicales y subtropicales, donde estos climas son favorables

para la supervivencia de las garrapatas (Jonsson, 1997). El impacto económico se debe al daño a las pieles por acción de las picaduras, pérdida de sangre, efectos tóxicos, reducción en la producción de leche y carne, en la producción de becerros y el incremento en los costos de control; además de los agentes etiológicos que transmiten como: virus, bacterias, rickettsias y protozoos (Ojeda-Chi *et al.*, 2011). El control de garrapata se basa principalmente en el uso de ixodicidas; sin embargo, su uso irracional ha propiciado la aparición de garrapatas resistentes a las principales familias de ixodicidas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006; 2007). Por la demanda de alimentos libres de residuos químicos y por el cuidado del ambiente, se sugiere la utilización de sistemas alternativos de control entre los que se pueden contar el empleo de nematodos (Hill, 1998), vacunas (Jonsson *et al.*, 2000), bacterias (Hassanain *et al.*, 1997), aceites esenciales (Prates *et al.*, 1998) y hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* (*B. bassiana*) y *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae*) (López *et al.*, 2009). Se tiene reportado que estos hongos causan mortalidad en garrapatas adultas, a la vez que disminuyen su fecundidad (Kaaya y Hassan, 2000; Benjamín *et al.*, 2002; Da Costa *et al.*, 2002). En Colombia utilizaron *M. anisopliae* en *R. microplus* en laboratorio y campo, reportando 90-96% en disminución reproductiva de ovoposición y en campo un 75% de reducción en la infestación de reses en campo (López *et al.*, 2009). En Chile, Broglio *et al.* (2012) utilizaron *M. anisopliae* (mortalidad 92 a 100%) y *B. bassiana* (44 a 100%) en teleoginas de *R. microplus*. La patogenicidad de *Paecylomyces fumosoroseus* (*P. fumosoroseus*) y su uso potencial como biocontrolador está documentado (Osborne y Landa, 1992; Pozo y Rodríguez, 2003, Chan *et al.*, 2010). En México la cepa Ma34 de *M. anisopliae* ha demostrado ser eficaz para el control de fases adultas de *R. microplus* en condiciones de laboratorio (100% de eficacia, Ojeda-Chi *et al.*, 2010) y de campo sobre bovinos (40-90% de eficacia Alonso-Díaz *et al.*, 2007). La cepa Ma14 y la mezcla de Ma14+Ma34 han demostrado tener mejor eficacia en condiciones *in vitro* e *in vivo* (larvas en pasto) (Ojeda-Chi *et al.*, 2010); debido a que Bb, Ma y Pfr han tenido efectividad sobre varios insectos y garrapatas, se espera óptima virulencia, sin embargo, no han sido probadas otras cepas y la combinación de ellas. Por tal motivo el objetivo del presente estudio es evaluar la eficacia de las cepas Ma34, Ma198, Ma181,

Ma14 de *M. anisopliae*, Bb174 y Bb249 de *B. bassiana* para el control de *R. microplus* y *A. cajennense* sobre fase adulta y la eficiencia de Pfr13 de *P. fumosoroseus*, Ma198, Bb249, Bb249+Ma198, Pfr13+Ma198, Bb249+Pfr13 y Bb249+Ma198+Pfr13 en huevos de *R. microplus* en condiciones *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

El avance del estudio se realizó en el Laboratorio de Control Biológico No. 1 de Patología de Insectos y Ácaros de la DES (Dependencia de Educación Superior) Ciencias Agropecuarias, de la Universidad de Colima, ubicado en el km 40 de la carretera Colima-Manzanillo en Tecomán, Colima, México. Los hongos entomopatógenos que se utilizaron en esta investigación están depositados en la Colección de Hongos Entomopatógenos de la DES Ciencias Agropecuarias. Los hongos fueron cultivados en agar dextrosa Sabouraud (SDA) (Moorhouse *et al.*, 1993) con 500 ppm de cloranfenicol (Sneh, 1991), incubados en 25°C y 70% HR por 3 semanas y los conidios fueron extraídos para obtener una concentración de 1×10^8 conidias/ml, la cual se diluyó en 0.1% de Tween 80 y se agitaron durante 3 min. Para la realización del bioensayo se obtuvieron garrapatas adultas procedentes del estado de Colima, México. Se transportaron al laboratorio, se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio al 0.1% durante 10 segundos, seguidos por tres lavados con agua destilada estéril (Kaaya y Hassan, 2000). Se formaron grupos de 5 garrapatas en cada caja de Petri, 30 de *R. microplus* y 30 de *A. cajennense* que fueron inoculadas mediante la técnica de inmersión utilizada por Kaaya *et al.*, (1996) con 6 cepas diferentes, inoculadas a la concentración de 1×10^8 conidias/ml durante 5 seg. colocadas en cajas de Petri con doble capa de papel filtro húmedo; los huevos de *R. microplus* se formaron en grupos de 20 en cada caja de Petri con 4 repeticiones asperjados con 8 tratamientos de cepas a la concentración de 1×10^8 conidias/ml, el grupo testigo asperjado con agua y Tween 80; después de la inoculación se dejaron en incubación a 25°C y cada 5 días se registró el número de garrapatas y huevos muertos por micosis. La micosis fue considerada cuando el cuerpo de la garrapata y el huevo se les observaron estructuras

fúngicas características de la cepa inoculada. Los resultados previos hasta aquí obtenidos se trataron con estadística descriptiva para los adultos, el análisis de varianza y prueba de comparación de medias ($P < 0.05$) para los huevos de *R. microplus* utilizando paquete estadístico SAS (SAS, 1991) y así conocer los porcentajes de efectividad con cada tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados sugieren que la cepa Ma198 fue la más eficaz con un 80% en *A. cajennense* y un 100% en *R. microplus*, seguido por un 60% de eficacia con las cepas Ma181 y Bb249 en *A. cajennense* en adultos.

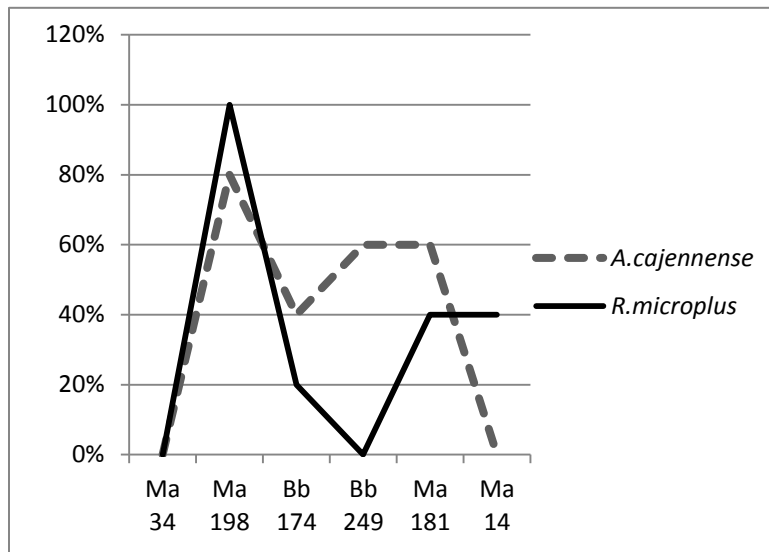


Figura 1.- Porcentajes de efectividad virulenta en garrapatas adultas con los géneros *A. cajennense* y *R. microplus*, con las diferentes cepas Ma34, Ma198, Bb174, Bb249, Ma182 y Ma14.

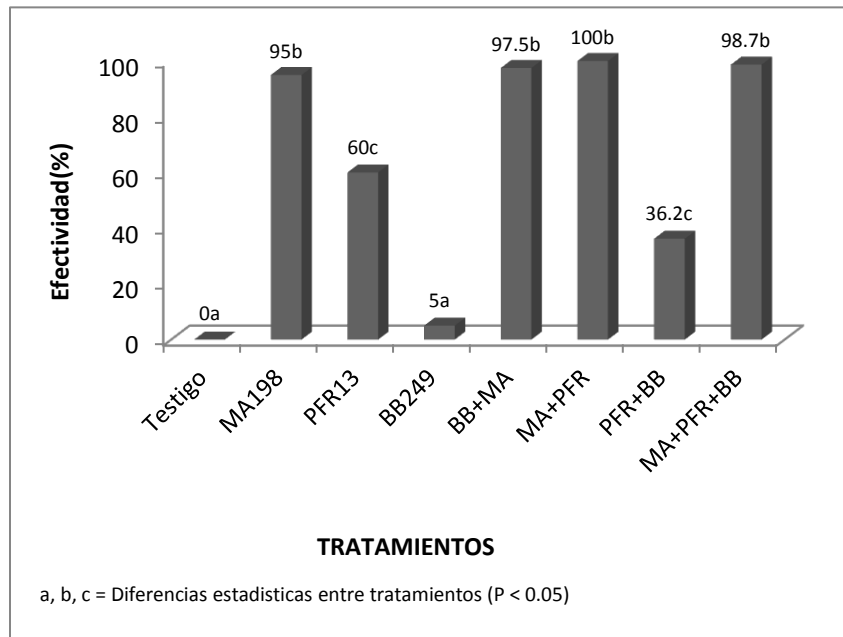


Figura 2.- Porcentajes de efectividad virulenta en huevos de *R. microplus* con Ma198, Bb249, Pfr13, Bb249+Ma198, Ma198+Pfr13, Pfr13+Bb249, Ma198+Pfr13+Bb249 y el testigo de agua con tween 80.

La cepa Ma198 fue la más efectiva mostrando 100% de virulencia en *R. microplus*, 80% *A. cajennense* en adultos y 95% en huevos de *R. microplus*; los huevos de *R. microplus* sometidos a tratamientos mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) donde Ma198, Bb249+Ma198, Pfr13+Ma198 y Bb249+Pfr13+Ma198 con efectividad de 95 a 100%. Estos resultados son similares a los reportados en Brasil ($>50\%$) en ninfas de *A. cajennense* con *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Lopes *et al.*, 2007); Kaaya *et al.*, 2011 con $>70\%$ de reducción en garrapatas adultas de *R. e. evertsi* y *R. decoloratus*. En Veracruz, México (40 a 91%) en infestaciones naturales, para el control de *R. microplus* (Castro *et al.*, 1997; Polar *et al.*, 2005; Alonso-Díaz *et al.*, 2007) con *M. anisopliae*. Por otra parte, Ojeda-Chi *et al.* (2011) evaluaron el efecto de la mezcla de *M. anisopliae* (Ma14+Ma34) en condiciones de laboratorio sobre larvas de *R. microplus* encontrando 90% de eficacia; por el contrario, en el presente trabajo se observó 0% de Ma34 tanto en *A. cajennense* como en *R. microplus* y con Ma14 un 0% en *A. cajennense* y 40% en *R. microplus* en garrapatas adultas. En huevos de *R. microplus*, las mezclas de Bb249+Ma198, Ma198+Pfr13 y Bb249+Pfr13+Ma198 resultaron efectivas. En ciertas condiciones la patogenicidad de *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* está influenciada por factores macroclimáticos (temperatura, humedad y radiación solar) como microclimáticos (temperatura de la piel, química de las secreciones de la piel microflora) los cuales influyen en el nivel de infección de los hongos entomopatógenos (germinación y penetración) (Fernandes *et al.*, 2012). Estos resultados demuestran que el tratamiento con Ma198 es eficaz para el control de garrapatas adultas y huevos de *R. microplus*, así como de garrapatas adultas de *A. cajennense*. La mezcla Ma198+Pfr13 con 100% de efectividad, seguidos de Ma198+Bb249+Pfr13 con 98.7% y Ma198+Bb249 con 97.5% de efectividad en huevos de *R. microplus*.

CONCLUSIONES

La cepa de *M. anisopliae* 198 resultó más efectiva para el control biológico de garrapatas adultas de *A. cajennense* y *R. microplus*, así como de huevos de *R. microplus*. Se observó que las combinaciones de *M. anisopliae* con *B. bassiana*, *M.*

anisopliae con *P. fumosoroseus* y la combinación de estos tres hongos entomopatógenos, también son viables para el control de garrapata, sin embargo, es necesario realizar más estudios probando las cepas con diferentes estadios de garrapata enfocados a mejorar la virulencia de los hongos entomopatógenos.

BIBLIOGRAFIA

- Alonso-Díaz M A., García L., Galindo-Velasco E., Lezama-Gutiérrez R., Angel-Sahagún C A., Rodríguez-Vivas R I. y Fragoso-Sánchez H. 2007. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. *Vet Parasitol.* 147: 336–340.
- Benjamín M., Zhioua E. y Ostfeld R. 2002. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 5: 723-728.
- Broglio M S M F., Souza L A., Valente E C N., Araújo M C J., Silva D N. y Gómez T M L. 2012. Evaluation of entomopathogenic fungi as biological control agents *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *IDESIA.* 30: 93-99.
- Castro A B A., Bittencourt V R E P., Deamon E. y Viegas E D C. 1997. Eficacia do fungo *Metarhizium anisopliae* aobreo carrapatao *Boophilus microplus* em teste de estabulao. *Rev Univ Rural Ser Cienc Vida.* 19:73-82.
- Chan C W., Ruiz S E., Cristóbal A J., Pérez G A., Munguía R R. y Lara R J. 2010. Desarrollo *in vitro* de cuatro cepas nativas de *Paecilomyces fumosoroseus* y su patogenicidad en estados inmaduros de mosquita blanca. *Rev. Agro.* 5: 587-597.
- Da Costa G., Sarquis M., De Moraes A. y Bittencourt V. 2002. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887); in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathol.* 4: 207-209.
- Fernandes E K K., Bittencourt V R E P. y Roberts D W. 2012. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Exp. Parasitol.* 130: 300-305.

H

- assanain M., El-Garby M., Abdel-Ghaffar F., El-Sharaby A. y Abdel-Meged K. 1997. Biological control studies of soft and hard ticks in Egypt. The effect of *Bacillus thuringiensis* varieties of soft and hard tick (Ixodidae). Parasitol Res. 3:209-213.
- Hill E. 1998. Entomopathogenic nematodes as control agents of development stages of the black legged tick: *Ixodes scapularis*. J Parasitol. 6:1124-1127.
- Jonsson N. N. 1997. Control of cattle ticks (*Boophilus microplus*) on Queensland dairy farms. Aust Vet J. 11: 802-807.
- Jonsson N.N., Matschoss A., Pepper P., Green P., Albrecht M., Hungerford J. y Ansell J. 2000. Evaluation of tickGARD Plus; a novel vaccine against *Boophilus microplus*; in lactating Holstein-Friesian cows. Vet Parasitol. 3: 275-285.
- Kaaya G P., Mwangi E N. y Ouna E A., 1996. Prospects for biological control of livestock ticks. *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum* using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. J Invertebr Pathol. 67:15–20.
- Kaaya G P., Samish M., Hedimbi M., Gindin G. y Glazer I. 2011. Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. Exp Appl Acarol. 3:273-81.
- Kaaya G P. y Hassan S. 2000. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. Exp Appl Acarol. 12: 913-926.
- López E., López G. y Orduz S. 2009. Control of the cattle tick *Boophilus microplus* with *Metarhizium anisopliae*, laboratory and field studies. Rev Col Entomol. 1: 42-46.
- Lopes R B., Alves S B., Padulla L F. y Pérez C A. 2007. Efficiency of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* formulations on *Amblyomma cajennense* (fabricius, 1787) nymphae. Rev Bras Parasitol Vet. 1:27-31.
- Moorhouse E R., Gillespie A T. y Charnley A K. 1993. Selection of virulent and persistent *Metarhizium anisopliae* isolates to control black vine weevil (*Otiorynchus sulcatus*) larvae on glasshouse begonia. J Invertebr Pathol. 62:47–52.
- Ojeda-Chi M M., Rodriguez-Vivas R I., Galindo-Velasco E. y Lezama-Gutiérrez R. 2010. Laboratory and field evaluation *Metarhizium anisoplae* (Deuteromycotina:

- Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexican tropics. *Vet Parasitol.* 170: 348-354.
- Ojeda-Chi M M., Rodríguez-Vivas R I., Galindo-Velasco E., Lezama-Gutiérrez R. y Cruz-Vázquez R. 2011. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso de hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hipoocreales: Clavicipitaceae). *Rev Mex Cienc Pecu.* 2: 77-192.
- Osborne L S. y Landa Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomol.* 4: 456-471.
- Polar P., Aquino De Muro M., Kairo M., Moore D., Pegram R., John S A., Roach-Benn C. 2005. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. *Vet Parasitol.* 134:159-167.
- Pozo N M. y Rodríguez A D. 2003. Alternativa para el manejo de *Trialeurodes vaporariorum* Westwood en tomate orgánico en Uruguay. *Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas España.* 2: 211- 218.
- Prates H., Leite B R., Craveiro C A. y Oliveira D A. 1998. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). *J Braz Chemic Soc.* 2: 193-197.
- Rodríguez-Vivas R I., Alonso-Díaz M A., Rodríguez-Arevalo F., Fragoso-Sánchez H., Santamaria V M. y Rosario-Cruz R. 2006. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the state of Yucatan, México. *Vet Parasitol.* 136:335–442.
- Rodríguez-Vivas R I., Rivas A L., Chowell G., Fragoso S H., Rosario C R. y Garcia Z. 2007. Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico. *Vet Parasitol.* 146:158–169.
- SAS (Statistical Analysis System), 1991. SAS/STAT Guide for Personal Computers version 6. 03. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Sneh B., 1991. Isolation of *Metarhizium anisopliae* from insects on an improved selective medium based on wheat germ. *J Invertebr Pathol.* 58:269–273.

ARTICULO II

EVALUACIÓN *in vitro* DE LA EFICACIA DE *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* Y *Paecilomyces fumosoroseus* EN GARRAPATAS (*R. microplus*) EN MICHOACÁN

Elisa Valdez-Martínez¹, Ernestina Gutiérrez-Vázquez¹, Margarita Vargas-Sandoval², Aureliano Juárez-Caratachea¹, Guillermo Salas-Razo¹, Rogelio Garcidueñas-Piña³.
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo- ¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Carretera Morelia-Zinapécuaro km 9.5, Tarímbaro, Michoacán, CP 58880, México. ² Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Paseo Lázaro Cárdenas esq. Berlín s/n, Col. Viveros, Uruapan, Michoacán, CP 60170, México ³ Av. Acueducto Esq. Tzintzuntzan Col. Matamoros, Morelia, Michoacán 58130 México

RESUMEN

La garrapata *Rhipicephalus Boophilus microplus* (*R. microplus*) es un ectoparásito que afecta al ganado bovino, transmitiéndole enfermedades y ocasionándole una disminución en la producción de carne y leche. Una alternativa de control biológico son los hongos entomopatógenos. El objetivo fue evaluar la eficacia de las cepas Ma198 de *M. anisopliae*, Bb249 de *B. bassiana* y Pfr13 de *P. fumosoroseus* y sus combinaciones Bb249+Ma198, Pfr13+Ma198, Bb249+Pfr13 y Bb249+Ma198+Pfr13 para el control de *R. microplus* adultos nativos del estado de Michoacán en condiciones *in vitro*. Las garrapatas de *R. microplus* se formaron en grupos de 20 en cada caja de Petri con 4 repeticiones que fueron inoculadas mediante la técnica de inmersión durante 5 seg con 8 tratamientos de cepas a la concentración de 1×10^8 conidias/ml, el grupo testigo asperjado con agua y Tween 80; después de la inoculación se dejaron en incubación a

25°C. La cepa Ma198 fue la más virulenta con 97.5%, seguido por 93.7% de virulencia con las cepas Pfr13 y Ma198+Bb249+Pfr13 en *R. microplus* en adultos.

Palabras clave: Control biológico, garrapata, hongos entomopatógenos

***In vitro* EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF *Metarhizium anisopliae* AND *Beauveria bassiana* AND *Paecilomyces fumosoroseus* IN TICKS (*R. microplus*) IN MICHOACÁN**

ABSTRACT

The tick *Rhipicephalus Boophilus microplus* (*R. microplus*) is an ectoparasite affecting cattle, transmitting diseases and causing a decrease in the production of meat and milk. Alternative biological controls are entomopathogenic fungi. The objective was to evaluate the effectiveness of the Ma198 strains of *M. anisopliae*, BB249 of *B. bassiana* and Pfr13 *P. fumosoroseus* and their combinations Bb249+Ma198, Pfr13+Ma198, Bb249+Pfr13 and Bb249+Ma198+Pfr13 for the control of *R. microplus* adult natives of the state of Michoacan in *in vitro* conditions. The ticks of *R. microplus* formed in groups of 20 in each Petri dish with 4 replications that were inoculated using the immersion technique during 5 sec with 8 treatments of strains to the concentration of 1×10^8 conidia/ml, the group witness sprinkled with water and Tween 80; After inoculation were left in incubation at 25 °C. Ma198 was the most virulent with a 97.5 %, followed by a 93.7 % virulence strains with the Pfr13 and Ma198+Bb249+Pfr13 in *R. microplus* in adults.

Keywords: Biological control, ticks, entomopathogenic fungi

INTRODUCCION

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (*R. microplus*) se considera el principal ectoparásito que afecta el ganado bovino en las zonas tropicales (Rodríguez-Vivas *et al.*, 1998). Por su importancia económica y sanitaria *R. microplus* ha sido la principal especie controlada en las campañas realizadas en México desde 1975 (Solís, 1991). El control de garrapata se basa principalmente en el uso de ixodicidas; sin embargo, su uso irracional ha propiciado la aparición de garrapatas resistentes a las principales familias de ixodicidas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006; 2007). Por la demanda de alimentos libres de residuos químicos y por el cuidado del ambiente, se sugiere la utilización de sistemas alternativos de control biológico entre los que se pueden contar el empleo de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* (*B. bassiana*) y *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae*) (López *et al.*, 2009). Se tiene reportado que estos hongos causan mortalidad en garrapatas adultas, a la vez que disminuyen su fecundidad (Kaaya y Hassan, 2000; Benjamín *et al.*, 2002; Da Costa *et al.*, 2002). En Colombia utilizaron *M. anisopliae* en *R. microplus* en laboratorio y campo, reportando 90-96% en disminución reproductiva de ovoposición y en campo un 75% de reducción en la infestación de reses en campo (López *et al.*, 2009). En Chile, Broglio *et al.* (2012) utilizaron *M. anisopliae* (mortalidad 92 a 100%) y *B. bassiana* (44 a 100%) en teleoginas de *R. microplus*. La patogenicidad de *Paecylomyces fumosoroseus* (*P. fumosoroseus*) y su uso potencial como biocontrolador está documentado (Osborne y Landa, 1992; Pozo y Rodríguez, 2003, Chan *et al.*, 2010). En México la cepa Ma34 de *M. anisopliae* ha demostrado ser eficaz para el control biológico de fases adultas de *R. microplus* en condiciones de laboratorio (100% de eficacia, Ojeda-Chi *et al.*, 2010) y de campo sobre bovinos (40 a 90% de eficacia Alonso-Díaz *et al.*, 2007). La cepa Ma14 y la mezcla de Ma14+Ma34 han demostrado tener mejor eficacia en condiciones *in vitro* e *in vivo* (larvas en pasto) (Ojeda-Chi *et al.*, 2010); debido a que *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. fumosoroseus* han tenido efectividad sobre varios insectos y garrapatas, se espera óptima virulencia, sin embargo, no han sido probadas otras cepas y la combinación de ellas. El objetivo fue evaluar la eficacia de las cepas Ma198 de *M. anisopliae*, Bb249 de *B. bassiana* y Pfr13 de *P. fumosoroseus* y sus combinaciones Bb249+Ma198, Pfr13+Ma198, Bb249+Pfr13 y Bb249+Ma198+Pfr13 para el control de *R. microplus* en condiciones *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en Uruapan, Michoacán. Los hongos entomopatógenos que se utilizaron en esta investigación están depositados en la Colección de Hongos Entomopatógenos de la Universidad de Colima. Los hongos fueron cultivados en agar dextrosa Sabouraud (SDA) (Moorhouse *et al.*, 1993) con 500 ppm de cloranfenicol (Sneh, 1991), incubados en 25°C y 70% HR por 3 semanas y los conidios fueron extraídos para obtener una concentración de 1×10^8 conidias/ml, la cual se diluyó en 0.1% de Tween 80 y se agitaron durante 3 min. Para la realización del bioensayo se obtuvieron garrapatas adultas procedentes del estado de Michoacán, México. Se transportaron al laboratorio, se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio al 0.1% durante 10 segundos, seguidos por tres lavados con agua destilada estéril (Kaaya y Hassan, 2000). Las garrapatas de *R. microplus* se distribuyeron aleatoriamente en grupos de 20, en cada caja de Petri con 4 repeticiones, las cuales fueron inoculadas mediante la técnica de inmersión durante 5 seg utilizada por Kaaya *et al.*, (1996) con 8 tratamientos de cepas a la concentración de 1×10^8 conidias/ml, el grupo testigo asperjado con agua y Tween 80; después de la inoculación se dejaron en incubación a 25°C y cada 5 días se registró el número de garrapatas muertas por micosis. La micosis fue considerada cuando al cuerpo de la garrapata se le observaron estructuras fúngicas características de la cepa inoculada. Los resultados se sometieron a análisis estadístico con comparación de medias ($P < 0.05$), prueba de Kruskal-Wallis, utilizando paquete estadístico Statistica (Statistica, 2006); y así conocer los porcentajes de efectividad con cada tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados sugieren que la cepa Ma198 fue la más virulenta con 97.5%, seguido por 93.7% de virulencia con las cepas Pfr13 y Ma198+Bb249+Pfr13 en *R. microplus* en adultos, los diferentes tratamientos mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) donde Ma198, Pfr13 y Ma198+Bb249+Pfr13 con efectividad de 93.7 a 97.5%.

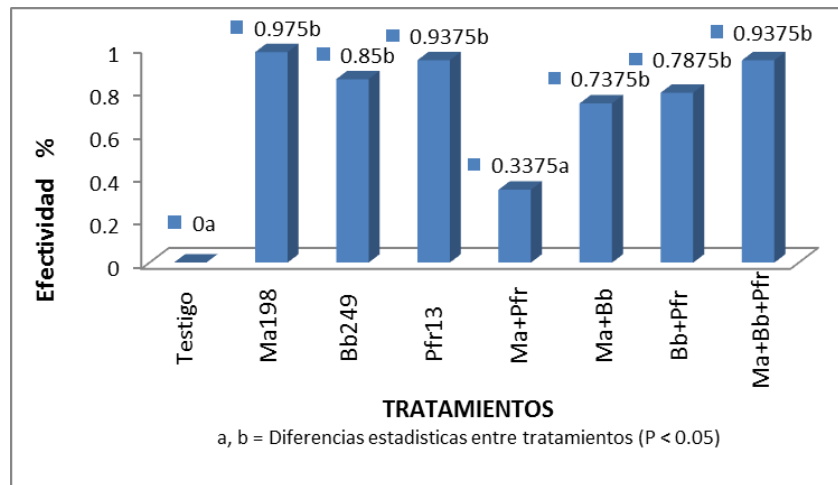


Figura 3.- Porcentajes de efectividad virulenta en garrapata adulta de *R. microplus* del estado de Michoacán con Ma198, Bb249, Pfr13, Bb249+Ma198, Ma198+Pfr13, Pfr13+Bb249, Ma198+Pfr13+Bb249 y el testigo de agua con tween 80.

Estos resultados son similares a los reportados en Brasil (>50%) en ninfas con *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Lopes *et al.*, 2007); Kaaya *et al.*, 2011 con >70% de reducción en garrapatas adultas de *R. e. evertsi* y *R. decoloratus*. En Veracruz, México (40-91%) en infestaciones naturales, para el control de *R. microplus* (Castro *et al.*, 1997; Polar *et al.*, 2005; Alonso-Díaz *et al.*, 2007) con *M. anisopliae*. Por otra parte, Ojeda-Chi *et al.*, (2011) evaluaron el efecto de la mezcla de *M. anisopliae* (Ma14+Ma34) en condiciones de laboratorio sobre larvas de *R. microplus* encontrando 90% de eficacia. En ciertas condiciones la patogenicidad de *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* está influenciada por factores macroclimáticos (humedad, temperatura y radiación solar) como microclimáticos (temperatura de la piel, química de las secreciones de la piel microflora) los cuales influyen en el nivel de infección de los hongos entomopatógenos (germinación y penetración) (Fernandes *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

Estos resultados demuestran que el tratamiento con la cepa Ma198 es eficaz con 97.5%, seguido de Ma198+Bb249+Pfr13 y Pfr13 con 93.7% de efectividad para el control de garrapatas adultas de *R. microplus*.

BIBLIOGRAFIA

- Alonso-Díaz M A., García L., Galindo-Velasco E., Lezama-Gutiérrez R., Angel-Sahagún C A., Rodríguez-Vivas R I. y Fragoso-Sánchez H. 2007. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. *Vet Parasitol.* 147: 336–340.
- Benjamín M., Zhioua E. y Ostfeld R. 2002. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 5: 723-728.
- Broglio M S M F., Souza L A., Valente E C N., Araújo M C J., Silva D N. y Gómez T M L. 2012. Evaluation of entomopathogenic fungi as biological control agents *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *IDESIA.* 30: 93-99.
- Castro A B A., Bittencourt V R E P., Deamon E. y Viegas E D C. 1997. Eficacia do fungo *Metarhizium anisopliae* aobreo carrapatao *Boophilus microplus* em teste de estabulao. *Rev Univ Rural Ser Cienc Vida.* 19:73-82.
- Chan C W., Ruiz S E., Cristóbal A J., Pérez G A., Munguía R R. y Lara R J. 2010. Desarrollo *in vitro* de cuatro cepas nativas de *Paecilomyces fumosoroseus* y su patogenicidad en estados inmaduros de mosquita blanca. *Rev Agro.* 5: 587-597.
- Da Costa G., Sarquis M., De Moraes A. y Bittencourt V. 2002. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887); in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathol.* 4: 207-209.
- Fernandes E K K., Bittencourt V R E P. y Roberts D W. 2012. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Exp Parasitol.* 130: 300-305.
- Kaaya G P., Mwangi E N. y Ouna E A., 1996. Prospects for biological control of livestock ticks. *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum* using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol.* 67:15–20.

- Kaaya G P., Samish M., Hedimbi M., Gindin G. y Glazer I. 2011. Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. *Exp Appl Acarol.* 3:273-81.
- Kaaya G P. y Hassan S. 2000. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Exp Appl Acarol.*12: 913-926.
- López E., López G. y Orduz S. 2009. Control of the cattle tick *Boophilus microplus* with *Metarhizium anisopliae*, laboratory and field studies. *Rev Col Entomol.* 1: 42-46.
- Lopes R B., Alves S B., Padulla L F. y Pérez C A. 2007. Efficiency of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* formulations on *Amblyomma cajennense* (fabricius, 1787) nymphae. *Rev Bras Parasitol Vet.* 1:27-31.
- Moorhouse E R., Gillespie A T. y Charnley A K. 1993. Selection of virulent and persistent *Metarhizium anisopliae* isolates to control black vine weevil (*Otiorynchus sulcatus*) larvae on glasshouse begonia. *J Invertebr Pathol.* 62:47–52.
- Ojeda-Chi M M., Rodriguez-Vivas R I., Galindo-Velasco E. y Lezama-Gutiérrez R. 2010. Laboratory and field evaluation *Metarhizium anisoplae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexican tropics. *Vet Parasitol.* 170: 348-354.
- Ojeda-Chi M M., Rodriguez-Vivas R I., Galindo-Velasco E., Lezama-Gutiérrez R. y Cruz-Vázquez R. 2011. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso de hongo entomópato genico *Metarhizium anisoplae* (Hipocreales: *Clavicipitaceae*). *Rev Mex Cienc Pecu.* 2: 77-192.
- Osborne L S. y Landa Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomol.* 4: 456-471.
- Polar P., Aquino De Muro M., Kairo M., Moore D., Pegram R., John S.A., Roach-Benn C. 2005. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. *Vet Parasitol.* 134:159-167.
- Pozo N M. y Rodríguez A D. 2003. Alternativa para el manejo de *Trialeurodes vaporariorum* Westwood en tomate orgánico en Uruguay. *Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas España.* 2: 211- 218.

- Rodríguez-Vivas R I., Alonso-Díaz M A., Rodríguez-Arevalo F., Fragoso-Sánchez H., Santamaria V M. y Rosario-Cruz R. 2006. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the state of Yucatan, México. *Vet Parasitol.*136:335–442.
- Rodríguez-Vivas R I., Domínguez-Alpizar J L. 1998. Grupos entomológicos de importancia veterinaria en Yucatán, México. *Rev Biomed.* 9: 26-37.
- Rodríguez-Vivas R I., Rivas A L., Chowell G., Fragoso S H., Rosario C R. y Garcia Z. 2007. Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico. *Vet Parasitol.* 146:158–169.
- Statistica (Statistica Six Sigma), 2006. Statistica Release 7. Stat Soft /Product licensed to Microsoft. STA365CO24733D. Copyright Stat soft Inc. US
- Sneh B. 1991. Isolation of *Metarhizium anisopliae* from insects on an improved selective medium based on wheat germ. *J Invertebr Pathol.* 58:269–273.
- Solís S S. 1991. Ecología de las garrapatas *Boophilus*: Perspectivas de panorama. Memorias de II Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten; 9-11 octubre 1991; Oaxtepec (Morelos) México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 19-30.

ARTICULO III

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. EN GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* EN GANADO BOVINO DE TRES MUNICIPIOS DE MICHOACÁN

Elisa Valdez-Martínez¹., Ernestina Gutiérrez-Vázquez¹., Margarita Vargas-Sandoval²., Aureliano Juárez-Caratachea¹., Guillermo Salas-Razo¹., Rogelio Garcidueñas-Piña³.
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo-¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Carretera Morelia-Zinapecuaro km9.5, Tarímbaro, Michoacán, CP 58880.; ²Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Paseo Lázaro Cárdenas esq. Berlín s/n, Col. Viveros, Uruapan, Michoacán CP 60170, México. ³Av. Acueducto Esq. Tzintzuntzan Col. Matamoros, Morelia, Michoacán 58130 México

RESUMEN

La garrapata *Rhipicephalus microplus* (Canestrini) produce el mayor problema global de ectoparásitos en la ganadería bovina de las regiones tropicales y subtropicales. Se evaluó la eficacia de la cepa de *Metarhizium anisopliae* Metsch. Sor. (Ma198) en el control de garrapatas adultas (*R. microplus*) en ganado bovino de razas Cebú, Brahmán, Criollo y Suizo. El tratamiento se aplicó en 7 hatos de ganado infestados de modo natural con garrapatas, en los municipios de Querendaro, Indaparapeo y Tzitzio del estado de Michoacán. Los animales fueron tratados por baños de aspersion con Ma198 a una concentración de 1×10^8 conidias/ml cada 15 días, por 6 veces realizando conteo de garrapatas en 2 hatos, con 12 bovinos cada uno. Los resultados *in vivo* demostraron una disminución en la población de garrapatas. El promedio inicial general de los tres municipios fue de 106.33 garrapatas por animal y finaliza con un promedio general de 7.95 garrapatas por animal después de las seis aplicaciones.

Palabras clave: Control biológico, *Metarhizium anisopliae*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

EFFECTIVENESS OF *Metarhizium anisopliae* ON TICKS *Rhipicephalus microplus* FROM INDAPARAPEO AND TZITZIO, MICHOACÁN

ABSTRACT

The tick *Rhipicephalus microplus* (Canestrini) produces the largest global problem of ectoparasites in the cattle of the tropical and subtropical regions. Evaluated the effectiveness of the strain of *Metarhizium anisopliae* Metsch. Sor. (Ma198) in the control of adult tick (*R. microplus*) in breeds of beef cattle cebu, brahman, creole and swiss. The treatment was applied in 7 cattle herds naturally infected with ticks in the localities of Querendaro, Indaparapeo and Tzitzio the state of Michoacan. The animals were treated by baths of spraying with Ma198 to a concentration of 1×10^8 conidia/ml every 15 days by 6 times doing tick count in 2 herds with 12 cattle each one. The results *in vivo* showed a decrease in the tick population. The initial average general of the three municipalities was of 106.33 garrapatas by animal and finalises with a general average of 7.95 garrapatas by animal after the six applications.

Key Words: biological control, *Metarhizium anisopliae*, *Rhipicephalus microplus*

INTRODUCCIÓN

El control de garrapata se basa principalmente en el uso de ixodicidas; sin embargo, su uso irracional ha propiciado la aparición de garrapatas resistentes a las principales familias de ixodicidas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006, 2007). Por la demanda de alimentos libres de residuos químicos y por el cuidado del ambiente, se sugiere la utilización de sistemas alternativos de control entre los que se pueden contar el empleo de nematodos (Hill, 1998), vacunas (Jonsson *et al.*, 2000), bacterias (Hassanain *et al.*, 1997), aceites esenciales (Prates *et al.*, 1998) y hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. (López *et al.*, 2009). Se tiene reportado que estos hongos causan mortalidad en garrapatas adultas, a la vez que disminuyen su fecundidad (Kaaya y Hassan, 2000; Benjamín *et al.*, 2002; Da Costa *et al.*, 2002). En Colombia utilizaron *M. anisopliae* en *Rhipicephalus microplus* (Canestrini) en laboratorio y campo, reportando de 90 a 96% en disminución reproductiva de ovoposición y en campo un 75% de reducción en la infestación de reses en campo (López *et al.*, 2009). En Chile, Broglio-Micheletti *et al.* (2012) utilizaron *M. anisopliae* (mortalidad de 92 a 100%) y *B. bassiana* (de 44 a 100%) en teleoginas de *R. microplus*. La patogenicidad de *Paecilomyces fumosoroseus* y su uso potencial como biocontrolador está documentado (Osborne y Landa, 1992; Pozo y Rodríguez, 2003; Chan *et al.*, 2010). En México la cepa Ma34 de *M. anisopliae* ha demostrado ser eficaz para el control de fases adultas de *R. microplus* en condiciones de campo sobre bovinos (40-90% de eficacia, Alonso-Díaz *et al.*, 2007). La cepa Ma14 y la mezcla de Ma14+Ma34 han demostrado tener mejor eficacia en condiciones *in vitro* e *in vivo* (larvas en pasto) (Ojeda-Chi *et al.*, 2010). Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la aspersión de la cepa Ma198 de *M. anisopliae* sobre la garrapata *R. microplus* del ganado bovino, en condiciones de pastoreo.

MATERIALES Y MÉTODO

Área-unidades de estudio. El estudio se realizó en 7 hatos con bovinos de doble propósito con animales de todas las edades en cada hato, “El Capire”, “El

Naranja”, “El Capulín”, “Cuicateo” pertenecientes a la tenencia de Tafetan, municipio de Tzitzio, con una temperatura promedio de 30°C (19°35’50” N y 100°55’21” W); “La Arpita” perteneciente al municipio de Indaparapeo, con una temperatura promedio de 24°C (19°47’38” N y 100°58’20” W); “Los Puchotes” y “Rincón de Zetina” pertenecientes al municipio de Queréndaro, con temperatura media de 23°C (19°80’87” N y 100°88’42”), el período de muestreo comprendió de octubre de 2013 a mayo de 2014. Las razas de bovinos que se utilizaron fueron: Suizo, Brahman, Cebú y Criollo. El criterio de selección para determinar las unidades que fueron sometidas a tratamiento fue que tuvieran en su cuerpo evidente estado de infestación de garrapatas. Los materiales para la aplicación de los baños fueron: hielera, bolsas de gel congeladas, contador, cepa Ma198 de *Metarhizium anisopliae*, cámara fotográfica, hojas de registros, tiras reactivas de pH, tween 80, agua, cubre bocas, guantes, mochilas de aspersión y lazos.

Cepa *M. anisopliae* y condiciones de cultivo. Los hongos entomopatógenos que se utilizaron en esta investigación están depositados en la Colección de Hongos Entomopatógenos de la DES Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Colima. Los hongos fueron cultivados en agar dextrosa (SDA) Sabouraud (Moorhouse *et al.*, 1993) con 500 ppm de cloranfenicol (Sneh, 1991), incubados en 25°C y 70% HR por 3 semanas y los conidios fueron extraídos para obtener una concentración de 1×10^8 conidios/ml, la cual se diluyó en 0.1% de Tween 80 y se agitaron durante 3 min. La cuantificación de conidios de esta suspensión se realizó en una cámara de Neubauer (Lezama y Munguía, 1990). El aislado se reprodujo en grano entero de arroz (Alves y Pereira, 1989; Lezama *et al.*, 1997).

Aplicación de *M. anisopliae*. La cepa Ma198 a una concentración de 1×10^8 conidias/ml, se trasladaba a la zona de trabajo en hielera con bolsas de gel congelantes, para después ser diluida la cepa con Tween 80 como adherente y agua (la cual ya se había medido con tiras reactivas de pH), se roció a los animales con las mochilas aspersoras y el personal de aplicación estuvo protegido con cubrebocas y ropa de apta; el baño se realizó siempre a favor del viento, en contra de la dirección del pelo y después de las cinco de la tarde; el ganado

estuvo retenido por lazos y posterior se dejaron los animales libremente en el campo. Se evaluaron los animales contando el número de garrapatas que tienen en el cuerpo, realizando este conteo de todo el lado izquierdo en un plano medial con ayuda de un contador multiplicando por dos, tomando registros cada 15 días (Spickett *et al.*, 1995; Polar *et al.*, 2005). Los resultados del conteo de garrapatas se sometieron a análisis de regresión con el paquete estadístico Statistica (Statistica, 2006) para observar la tendencia del número de garrapatas en el cuerpo de los animales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados sugieren que la cepa Ma198 es capaz de reducir las poblaciones de *R. microplus*, en condiciones de pastoreo, en todos los hatos se observó que hubo reducción de garrapatas, en algunos hatos fue más notorio en comparación de otros.

Al inicio del experimento, al grupo de animales a los que se le aplicó *M. anisopliae* 198 en la localidad de La Arpita municipio de Indaparapeo tuvieron en promedio 143.33 garrapatas por animal, a los 15 días después de la primera aplicación del tratamiento se redujo, en los animales tratados a 126.5 garrapatas por animal. A los siguientes 15 días aumentó a 137.25 y después de la tercera aplicación se observó la mayor disminución a 42.16 en todas las aplicaciones, para terminar después de la sexta aplicación con 12 garrapatas promedio por animal (Figura 1).

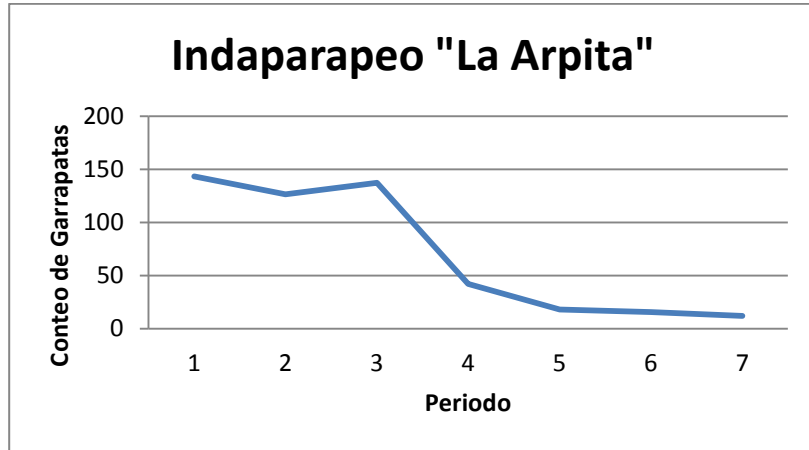


Figura 1.- Representación del conteo de garrapatas durante 6 períodos cada 15 días en el ejido de la Arpita municipio de Indaparapeo, Michoacán.

En la localidad El Capire perteneciente Tzitzio tuvieron en promedio 61 garrapatas por animal al inicio, a los 15 días después de la primera aplicación en los animales tratados se redujo a 41.66, para terminar después de la sexta aplicación a 2 garrapatas promedio por animal (Figura 2).

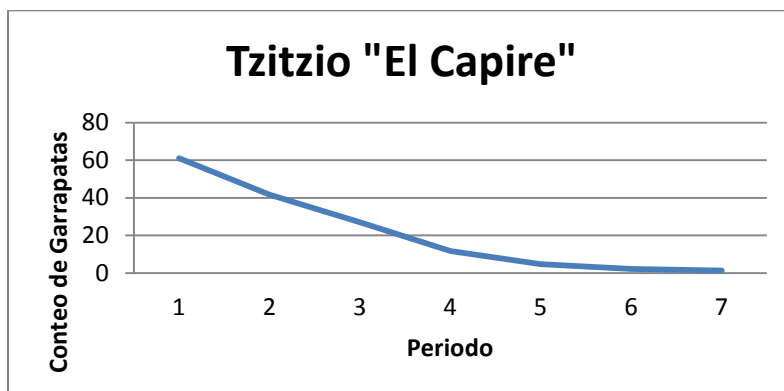


Figura 2.- Representación del conteo de garrapatas durante 6 períodos cada 15 días en el ejido el Capire tenencia Tafetán municipio de Tzitzio, Michoacán.

En la localidad El Capulín perteneciente a Tzitzio el promedio fue de 51.08 garrapatas por animal, al iniciar el tratamiento, a los 15 días después de la primera aplicación del tratamiento, se redujo la población a 35.33 garrapatas por animal. A los siguientes 15 días disminuyó a 6.25, para terminar después de la sexta aplicación con 0.41 garrapatas promedio por animal; este fue el hato que resultó con el promedio menor final de entre todos los hatos (Figura 3).

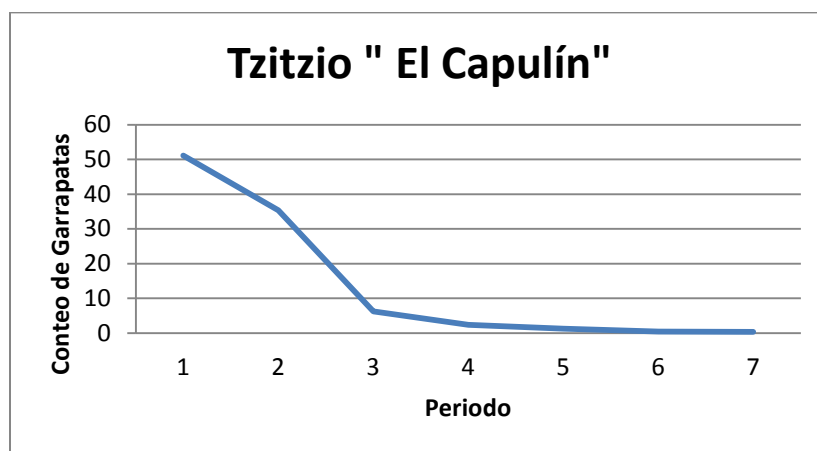


Figura 3.- Representación del conteo de garrapatas durante 6 periodos cada 15 días en el ejido “ El Capulín” tenencia Tafetán municipio de Tzitzio, Michoacán.

En la localidad de Cuicateo perteneciente al municipio de Tzitzio, inició con un promedio general de 201.7 garrapatas por animal, este hato tuvo su mejor respuesta después de la tercera aplicación descendió a 40.91 y finalizó con un promedio de 18.83 garrapatas promedio por animal, después de las seis aplicaciones (Figura 4).

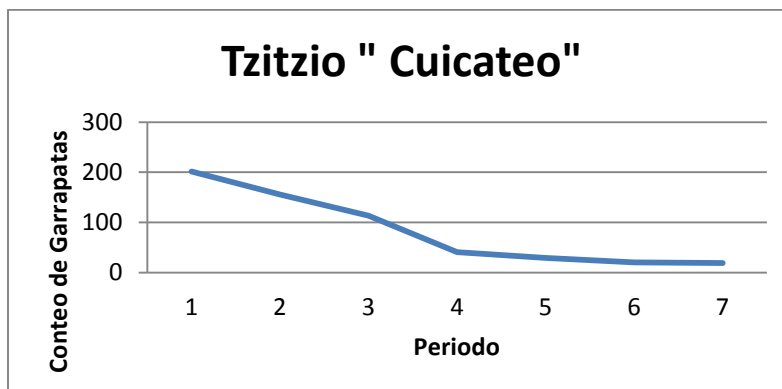


Figura 4.- Representación del conteo de garrapatas durante 6 períodos cada 15 días en el ejido de Cuicateo en el municipio de Tzitzio, Michoacán.

En la localidad de el Rincón de Zetina perteneciente al municipio de Queréndaro inició con un promedio general de 32.16 garrapatas, después de la primera aplicación descendió a 23.91 garrapatas y después de su segunda aplicación a 5.66 garrapatas por animal, dando como resultado final el promedio de 1.58 garrapatas después de la sexta aplicación (Figura 5).

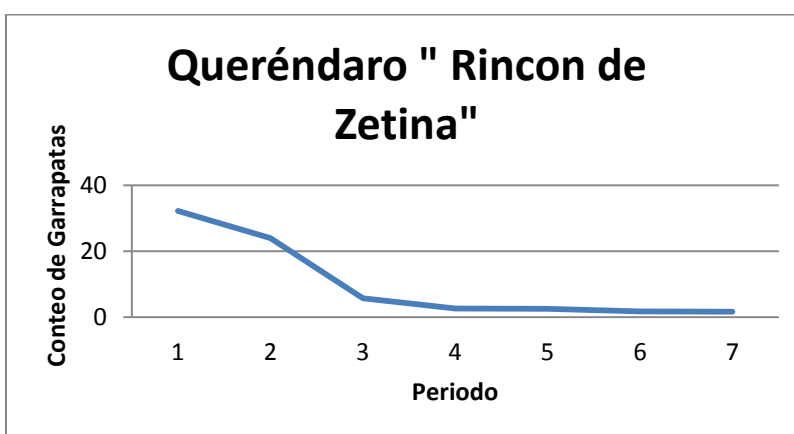


Figura 5.- Representación del conteo de garrapatas durante 6 períodos cada 15 días en el ejido de Rincón de Zetina municipio de Queréndaro, Michoacán.

La localidad de El Naranjo perteneciente al municipio de Tzitzio inició con un promedio general de 45.66 garrapatas por animal, después de su primer tratamiento esta cifra disminuyó a 35.66 garrapatas, este descenso fue el mayor de todas las aplicaciones con 10 garrapatas promedio, después de la segunda aplicación se incrementó a 37.41 garrapatas, este hato se caracterizó por ser el que quedó con mayor número de garrapatas promedio con 21 (Figura 6).

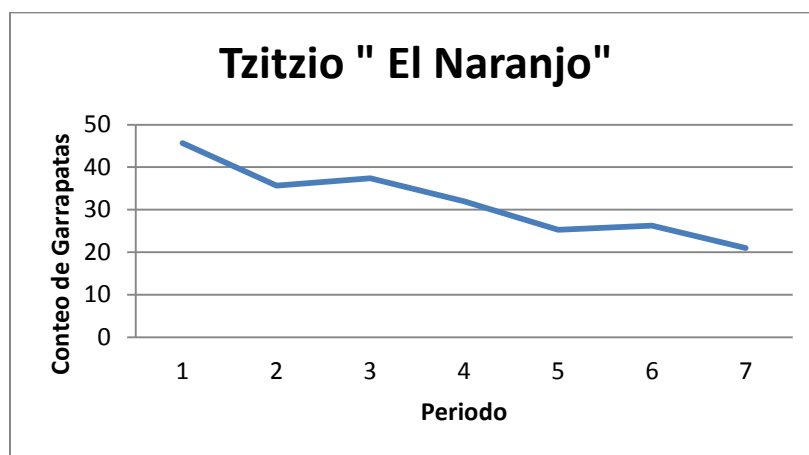


Figura 6.- Representación del conteo de garrapatas durante 6 períodos cada 15 días en el ejido de El Naranjo municipio de Tzitzio, Michoacán.

En la localidad Los Puchotes perteneciente al municipio de Queréndaro los animales tuvieron en promedio 146.16 garrapatas al inicio del experimento, a los 15 días después de la primera aplicación del tratamiento, disminuyó la población de garrapata en los animales tratados a 100.41 por animal. A los siguientes 15 días disminuyó a 35; terminando después de la sexta aplicación con 0.5 garrapatas promedio por animal (Figura 7).

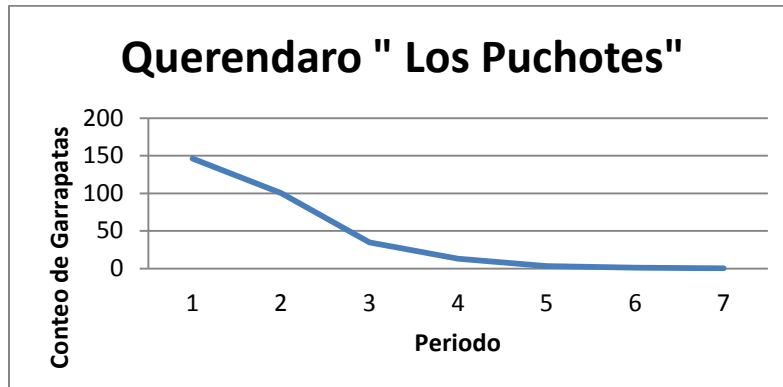


Figura 7.- Representación del conteo de garrapatas durante 6 períodos cada 15 días en el ejido de Los Puchotes municipio de Queréndaro, Michoacán.

Las localidades de Los Puchotes y El Capulín concluyeron con los promedios de garrapatas mínimos con 0.41 y 0.5 garrapatas respectivamente. Cuicateo y El Naranjo fueron las localidades que terminaron con el promedio de garrapata más aumentados con 18.83 y 21 garrapatas respectivamente.

El promedio general ya en conjunto de estos municipios pertenecientes al estado de Michoacán inicia con 106.33 garrapatas por animal y finaliza con un promedio general de 7.95 garrapatas por animal después de las seis aplicaciones. En general, el grado de infestación disminuyó a un 7.47% de infestación, como resultado final.

Probando diferentes modelos de regresión del conteo de garrapatas sobre el número de aplicaciones se determinó que el mejor modelo que describe el comportamiento del fenómeno está representado por un modelo cuadrático: $y = 3.5433x^2 - 44.795x + 148.43$ ($r^2 = 0.992$). En este modelo se predice una infestación inicial de 148.43 garrapatas por animal y se observa una mayor reducción en general después de la tercera aplicación, con un promedio de 51.71 garrapatas y posteriormente desciende a aproximadamente 7 garrapatas por

animal, lo que resulta en una reducción del 93% de la población de después de la sexta aplicación (Figura 8).

Estos resultados demuestran que la cepa Ma198 de *M. anisopliae* es efectiva en el control biológico de la garrapata. Aunque la reducción del conteo no llegó a cero, esto puede deberse a que los animales estuvieron expuestos a nuevas reinfestaciones dado que se mantuvieron en praderas abiertas al ambiente natural en el que conviven con las garrapatas.

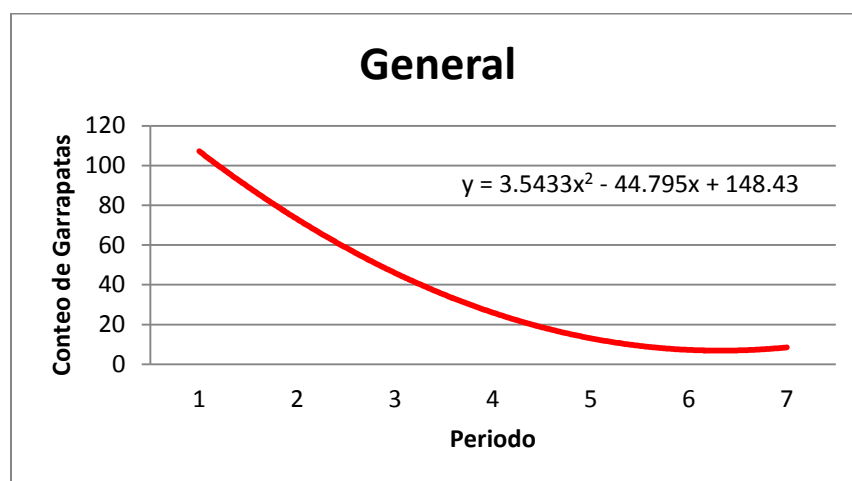


Figura 8.- Representación general del modelo de regresión polinomial de segundo grado, específico del conteo de garrapatas sometidas a tratamiento con Ma198 correspondientes a los municipios de Queréndaro, Indaparapeo y Tzitzio, del estado de Michoacán.

El ganado en el estado de Michoacán demuestra una decreciente población de garrapata *R. microplus* que han sido sometidas a la aplicación de Ma198 similar en infestaciones naturales, para el control de *R. microplus* (Castro *et al.*, 1997; Polar *et al.*, 2005; Alonso-Díaz *et al.*, 2007) con *M. anisopliae* que registran (40-91%) de eficacia; en donde, Alonso-Díaz *et al.*, 2007 reportó reducción de población de garrapata a partir de la segunda aplicación del tratamiento. Así como se coincide con Orozco (2005) con *M. anisopliae* en *R. microplus* en bovinos en condiciones de campo, en donde detectaron la disminución de las poblaciones de

garrapatas desde 52 garrapatas promedio hasta 8 garrapatas por animal, después de dos aplicaciones con una reducción de 84.6%. Kaaya *et al.*, (1996) y Bazán (2002) señalan que existe mortalidad de la garrapata. En cuanto a los trabajos realizados en praderas infestadas con larvas, las variaciones que se presentaron pueden estar influenciadas por las fórmulas utilizadas. Ángel-Sahagún *et al.*, (2010) evaluaron cuatro formulaciones, Tween 80, arcilla (Celite) aceite mineral (Citrolina) y salvado de trigo, obteniendo mayor eficacia en el grupo tratado con salvado de trigo con Ma14 (1×10^8) obtuvo una reducción 58.3% después de los 21 días post tratamiento. En ciertas condiciones la patogenicidad de *M. anisopliae* está influenciada por factores ambientales que interfieren con su crecimiento, producción del hongo y producción de micotoxinas (temperatura, humedad y pH, textura del suelo, composición de los sustratos o textura de suelo, radiación solar) como microclimáticos explica como intervienen estos factores (temperatura de la piel, química de las secreciones de la piel microflora) los cuales influyen en el nivel de infección de los hongos entomopatógenos (germinación y penetración) (Meyling y Eilenberg, 2007; Leemon *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

El tratamiento con Ma198 es capaz de reducir la población de garrapatas *R. microplus* en ganado bovino con problemas de infestación en praderas abiertas, en algunos municipios como Indaparapeo, Queréndaro y Tzitzio del estado de Michoacán.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Díaz M A., García L., Galindo-Velasco E., Lezama-Gutiérrez R., Angel-Sahagún C A., Rodríguez-Vivas R I. y Fragoso-Sánchez H. 2007. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. *Vet Parasitol.* 147: 336–340.
- Alves S B y Pereira R M. 1989. Producao de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. E. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Em bandejas. *Ecosistema, Espiritu Santo do Pinhal.* 14: 188-192.
- Ángel-Sahagún C A., Lezama-Gutiérrez R., Molina-Ochoa J., Pescador-Rubio A., Skoda S R., Cruz-Vázquez C. 2010. Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus = Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. *Vet Parasitol.* 170:278-286.
- Bazan T M. 2002. Efecto del hongo *M. anisopliae* (Ma18) sobre la garrapata *Boophilus microplus* del ganado bovino estabulado. Tesis de Maestría en Ciencias Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México.
- Benjamín M., Zhioua E. y Ostfeld R. 2002. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 5: 723-728.
- Broglio-Micheletti S M F., de Souza L A., Valente E C N., de Araújo M J C., Dias N. da Silva y Gómez-Torres M L. 2012 . Evaluation of entomopathogenic fungi as biological control agents *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *IDESIA (Chile).* 30(1): 93-99.
- Castro A B A., Bittencourt V R E P., Deamon E., Viegas E D C. 1997. Eficacia do fungo *Metarhizium anisopliae* aobreo carrapatao *Boophilus microplus* em teste de estabulao. *Rev Univ Rural Ser Cienc Vida.* 19:73-82.

- Chan C W., Ruiz S E., Cristóbal A J., Pérez G A., Munguía R R. y Lara R J. 2010. Desarrollo *in vitro* de cuatro cepas nativas de *Paecilomyces fumosoroseus* y su patogenicidad en estados inmaduros de mosquita blanca. *Rev Agro.* 5: 587-597.
- Da Costa G., Sarquis M., De Moraes A. y Bittencourt V R E P. 2002. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887); in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathol.* 4: 207-209.
- Fernandes E K K., Bittencourt V R E P., Roberts D W. 2012. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Exp Parasitol.* 130: 300-305.
- Hassanain M., El-Garby M, Abdel-Ghaffar F, El-Sharaby A y Abdel-Meged K. 1997. Biological control studies of soft and hard ticks in Egypt. The effect of *Bacillus thuringiensis* varieties of soft and hard tick (Ixodidae). *Parasitol Res.* 3:209-213.
- Hill E. 1998. Entomopathogenic nematodes as control agents of development stages of the black legged tick: *Ixodes scapularis*. *J Parasitol.* 6:1124-1127.
- Jonsson N N., Matschoss A., Pepper P., Green P., Albrecht M., Hungerford J. y Ansell J. 2000. Evaluation of tickGARD Plus; a novel vaccine against *Boophilus microplus*; in lactating Holstein-Friesian cows. *Vet Parasitol.* 3: 275-285.
- Kaaya G P., Mwangi E N. y Ouna E A. 1996. Prospects for Biological Control of Livestock Ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* y *Amblyomma variegatum*, using the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol.* 67: 15-20.
- Kaaya G P. y Hassan S. 2000. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Exp Appl Acarol.* 12: 913-926.
- Leemon D, Turner D, Jonsson N. 2008. Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Vet Parasitol.* 156:248-260.
- Lezama G R. y Munguía R R. 1990. Evaluación de cinco sustratos en la multiplicación masiva de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. y

- su virulencia sobre *Spodoptera frugiperda* J E. Smith. XII Reunión Nacional de Control Biológico. Colima, Col. México. p.7.
- Lezama-Gutiérrez R., Molina-Ochoa J., Rebolledo-Domínguez O., Trujillo de la Luz M., Gozález-Ramírez M., Briceño-Robles S. 1997. Evaluation of entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Anthonomus fulvipes* (Coleoptera: Curculionidae) in organically grown Barbados cherry trees. *Vedalia*. 4:25-29.
- López E., López G y Orduz S. 2009. Control of the cattle tick *Boophilus microplus* with *Metarhizium anisopliae*, laboratory and field studies. *Rev Col Entomol*. 1: 42-46.
- Meyling N, Eilenberg J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biol Control*. 43:145-155.
- Moorhouse E. R., Gillespie A. T. y Charnley A K. 1993. Selection of virulent and persistent *Metarhizium anisopliae* isolates to control black vine weevil (*Otiorynchus sulcatus*) larvae on glasshouse begonia. *J Invertebr Pathol*. 62:47-52.
- Ojeda-Chi M M., Rodríguez-Vivas R I., Galindo-Velasco E. y Lezama-Gutiérrez R. 2010. Laboratory and field evaluation *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexican tropics. *Vet Parasitol*. 170: 348-354.
- Orozco R E M. 2005. Efectividad de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. (Hyphomycetes) sobre garrapatas *Boophilus microplus* Can. (Acari:Ixodidae) de bovinos en condiciones de campo. Tesis de Licenciatura. Tecomán, Colima, México.
- Osborne LS., Landa L 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Fla Entomol*. 75: 456-471.
- Polar P., Aquino de Muro M., Kairo M., Moore D., Pegram R., John S A. y Roach-Benn C. 2005. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. *Vet Parasitol*. 134:159-167.

- Pozo N M y Rodríguez A D. 2003. Alternativa para el manejo de *Trialeurodes vaporariorum* Westwood en tomate orgánico en Uruguay. Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas España. 2: 211- 218.
- Prates H., Leite B R., Craveiro C A. y Oliveira D A. 1998. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). J Braz Chemic Soc. 2: 193-197.
- Rodríguez-Vivas R I., Alonso-Díaz M A., Rodríguez-Arevalo F., Fragoso-Sánchez H., Santamaria V M. y Rosario-Cruz R. 2006. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the state of Yucatan, México. Vet Parasitol. 136:335–442.
- Rodríguez-Vivas R I., Rivas A L., Chowell G., Fragoso S H., Rosario C R. y Garcia Z. 2007. Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico. Vet Parasitol. 146:158–169.
- Sneh B. 1991. Isolation of *Metarhizium anisopliae* from insects on an improved selective medium based on wheat germ. J Invertebr Pathol. 58:269–273.
- Spickett A M., Horak I G., Heyne H. y Braack L E O. 1995. The effect of severe drought on the abundance of ticks on vegetation and on scrub hares in the Kruger National Park. Koedoe. 38:59-64.
- Statistica (Statistica Six Sigma), 2006. Statistica Release 7. Stat Soft /Product licensed to Microsoft. STA365CO24733D. Copyright Stat soft Inc. US