

Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la inhibición de oviposición, eclosión y potencial reproductivo en una cepa triple resistente de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae)

Manuel Fernández Ruvalcaba¹, Angélica María Berlanga Padilla¹, Carlos Cruz Vázquez¹, Víctor Manuel Hernández Velázquez²

¹Centro Nacional de Investigaciones en Parasitología Veterinaria INIFAP. Km. 11.5 Carretera Federal Cuernavaca- Cuautla, Col. Progreso, Jiutepec, Morelos, México, C. P. 62550

²Centro de Investigaciones en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México, C. P. 62209

Resumen

FERNÁNDEZ RUVALCABA M, BERLANGA PADILLA AM, CRUZ VÁZQUEZ C, HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ VM. 2010. Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la inhibición de oviposición, eclosión y potencial reproductivo en una cepa triple resistente de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). ENTOMOTROPICA 25(3): 109-115.

En el presente trabajo se evaluaron los efectos de cuatro cepas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, denominadas Bb-M13J15, Bb-M14J18, Bb-M21J7, Bb-M5J5, y de nueve de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin, denominadas Ma-M12J15, Ma-M6J19, Ma-M5J15, Ma-M18J18, Ma-M14J9, Ma-M1J15, Ma-M14J13, Ma-M4J9 y Ma-M5J18, ambas especies de hongos de origen mexicano. La cepa comercial Ma-M26J1 fue usada como testigo positivo. Se utilizó la técnica de inmersión de hembras repletas de Drummond durante 60 segundos con cinco concentraciones usando el valor 0,5 como factor de dilución. Se determinó la concentración de inhibición de oviposición (CIO), de la eclosión (CIE) y del potencial reproductivo (CIPR). Cuatro cepas de *M. anisopliae* Ma-M14J9, Ma-M26J1, Ma-M12J15, Ma-M1J15 y una de *B. bassiana* Bb-M5J5 resultaron altamente infectivas para *R. (B.) microplus* triple resistente alcanzando un control sobre el potencial reproductivo de 90 % en concentraciones menores a 37×10^6 de conidios/ml.

Palabras clave adicionales: control biológico, hongo entomopatógeno, garrapata del ganado.

Abstract

FERNÁNDEZ RUVALCABA M, BERLANGA PADILLA AM, CRUZ VÁZQUEZ C, HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ VM. 2010. Evaluation of strains of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* upon oviposition inhibition, eclosion and reproductive potential of a triple resistant strain of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). ENTOMOTROPICA 25(3): 109-115.

The present study evaluated the effect of four *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin strains Bb-M13J15, Bb-M14J18, Bb-M21J7 and Bb-M5J5 and nine *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin strains namely Ma-M12J15, Ma-M6J19, Ma-M5J15, Ma-M18J18, Ma-M14J9, Ma-M1J15, Ma-M14J13, Ma-M4J9 and Ma-M5J18, both species isolated from Mexico. The commercial strain Ma-M26J1 was used as a positive control. Immersion Drummond test of engorged females (during 60 seconds) was used to evaluate the fungi, with five different concentrations with a value of 0.5 as dilution factor. We determined concentration of inhibition of

oviposition (OIC), eclosion (EIC) and reproductive potential (RPIC). It was found that four *M. anisopliae* strains Ma-M14J9, Ma-M26J1, Ma-M12J15, Ma-M1J15 and one of *B. bassiana* Bb-M5J5, were highly infective to resistant *R. (B.) microplus* reaching a 90 % of control of the reproductive potential with concentrations less than 37×10^6 conidia/ml.

Additional key words: biological control, cattle tick, entomopathogenic fungi.

Introducción

La garrapata del ganado, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae), es el ectoparásito más importante de la ganadería tropical y subtropical del mundo. Se caracteriza por causar diversos daños, tanto directos como indirectos, en la producción de carne, leche y pieles, siendo además un eficiente vector de la babesiosis y la anaplasmosis bovina (Núñez et al. 1985).

El control de *R. (B.) microplus*, se ha realizado generalmente por medio de la aplicación de acaricidas químicos, los cuales tienen efectos adversos para el medio ambiente (Shelton y Karns 1988, Kunz y Kemp 1994), además de ser costosos. La presión desmedida con estos productos ha favorecido la aparición del fenómeno de la resistencia a diversos acaricidas en poblaciones de *R. (B.) microplus* en todo el mundo (Kunz y Kemp 1994), lo que está obligando a la búsqueda de nuevas opciones de control no químico en el futuro inmediato, particularmente de origen biológico (De Castro 1997).

Una de las alternativas de control biológico que se ha explorado en los últimos años con resultados promisorios son los hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) y *Beauveria bassiana*, los cuales han demostrado ser patogénicos para varias especies de garrapatas (Zhioua et al. 1997, Guedes-Frazzon et al. 2000).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de 14 cepas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* aisladas en México, sobre la inhibición de oviposición (CIO), eclosión (CIE) y potencial

reproductivo (CIPR) de una cepa triple resistente de la garrapata *R. (B.) microplus*.

Materiales y Métodos

Garrapatas

Se utilizó una cepa de garrapatas *R. (B.) microplus* resistente a los acaricidas organofosforados (OF), piretroides sintéticos (PS) y amidinas (Am), denominada cepa triple resistente, la cual fue mantenida y reproducida en bovinos de raza Holstein susceptibles de 250 kg de peso corporal. La cepa se mantuvo mediante una infestación artificial con 1g de larvas y al día 21 post-infestación inició la caída de hembras repletas, las cuales fueron colectadas, seleccionadas y homogeneizadas por peso para realizar los bioensayos.

Hongos

Se utilizaron 13 cepas de hongos entomopatógenos, proporcionadas por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria-Dirección General de Sanidad Vegetal de Tecmán, Colima, México. De *B. bassiana* fueron utilizadas cuatro cepas denominadas Bb-M13J15, Bb-M14J18, Bb-M21J7, Bb-M5J5, y de *M. anisopliae*, nueve cepas denominadas Ma-M12J15, Ma-M6J19, Ma-M5J15, Ma-M18J18, Ma-M14J9, Ma-M1J15, Ma-M14J13, Ma-M4J9, Ma-M5J18 y una cepa comercial de *M. anisopliae* denominada Ma-M26J1 que se usó como testigo positivo.

Multipliación de los hongos

Las 14 cepas se multiplicaron sobre arroz, utilizando bolsas de polipapel con 250 g de

arroz previamente lavado y tratado con 130 ppm de una mezcla de tetraciclina y furazolidona, posteriormente se esterilizaron durante 15 minutos y se inocularon con 10 ml de una suspensión de 10^6 con/ml de cada una de las cepas a evaluar; se incubaron a 26 ± 1 °C, con fotoperíodo de 14:10h durante 16 ± 2 días. Al término de este tiempo, se procedió a formular las preparaciones de cada aislado para realizar los bioensayos. Los conidios de cada cepa fueron deshidratados y cosechados por tamizado, primero por tamices de 300 μ y después por 90 μ para eliminar los residuos sólidos (Hernández et al. 2003), se suspendieron en agua destilada conteniendo 0,1 % de Tween 80. La suspensión fue colocada en tubos estériles de vidrio y mezclados con un Vortex. La concentración de conidios fue estimada con hemocitometro y ajustada de acuerdo a como se indica en el bioensayo.

Bioensayos

Para evaluar el efecto de inhibición de oviposición (CIO), eclosión (CIE) y potencial reproductivo (CIPR) de las cepas de hongos hacia las garrapatas *R. (B.) microplus*, se empleó la técnica de inmersión de hembras repletas de Drummond (Drummond y Whetstone 1969). Se utilizaron 48 hembras de *R. (B.) microplus* con un rango de peso de 0,2 a 0,4 g por cada una de las cinco suspensiones de conidios a evaluar. Las garrapatas fueron sometidas a inmersión durante 60 s partiendo de una dosis de 50×10^6 hasta $3,125 \times 10^6$ conidios/ml utilizando el valor de 0,5 como factor de dilución, el tratamiento se administró individualmente en placas de cultivo de 24 pozos utilizando 1,5 ml del biopreparado. Una vez fuera de los pozos, las garrapatas se secaron y se incubaron en viales de vidrio individuales durante 20 días en cámara húmeda (90 % HR) a 25 °C, realizándose observaciones al microscopio a intervalos de 5, 10, 15 y 20 días para comprobar el desarrollo de fungosis. Se tuvo un grupo control que sólo recibió tratamiento con agua destilada y Tween 80 al 0,1 %. A los 14

días de incubación se retiró la masa de huevos depositada, se pesó individualmente la cantidad producida y se tomó una alícuota que se llevó a incubación para esperar la eclosión de las larvas.

Para determinar el porcentaje de inhibición de la oviposición, a los 21 días de incubación de las hembras repletas, se retiró la postura de cada una de ellas, pesando e incubando los huevecillos bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (28 °C y 90 % HR). Para realizar los cálculos del efecto del hongo sobre la oviposición se realizó la siguiente secuencia, como es obtener la relación de número de huevecillos depositados / peso de las hembras por grupo y lote:

$$OP = \frac{(\text{peso de huevecillos en gramos}) \times (20\ 000)}{\text{Peso de hembras en gramos}} \times (100)$$

Una vez obtenido este parámetro, tanto para individuos tratados como para testigos, se procedió a calcular:

$$\% IO = \frac{(OP/T - OP/t) (100)}{(OP/T)}$$

Donde:

O/PT = Reproducción estimada del grupo testigo.

O/Pt = Reproducción estimada del grupo tratado.

Para calcular la eclosión de larvas se tomaron cinco alicuotas y se realizó el conteo de cascarones rotos y no rotos hasta completar 100 huevos contados, procedentes de una muestra de huevo de 1 g incubada a 28 °C y 90 % HR por 35 días y previamente homogenizada. Con los resultados de los conteos se obtiene el promedio de eclosión para los diferentes tratamientos.

Para determinar el porcentaje de efectividad sobre el potencial reproductivo (CIPR) se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ IPR} = 1 - \frac{(A) (XL) (D) (XL) (100)}{(XL) (C) (XL)}$$

Donde:

A = Número promedio de garrapatas del lote testigo antes del tratamiento.

B = Número promedio de garrapatas del lote testigo por día, fase o ciclo completo posterior al tratamiento.

C = Número promedio de garrapatas del lote tratado antes del tratamiento.

D = Número promedio de garrapatas del lote tratado por día, fase o ciclo completo posterior al tratamiento.

XL = Número promedio de larvas viables el cual se obtiene de la siguiente fórmula:

$$XL = \frac{(\text{Phg}) (200\ 000) (\text{F.C. \% eclosión})}{\text{No. de hembras}}$$

Phg = Peso de huevecillos en gramos.

200 000 = Constante, número promedio de larvas presentes en 1 g.

F.C. % Eclosión = Fracción centesimal del porcentaje de eclosión (Drummond et al. 1967, Drummond y Whetstone 1969).

Los datos fueron analizados mediante la metodología Probit utilizando el programa POLO-PC (LeOra Software 2002), y se determinaron las $CL_{50, 90, 99}$ sobre los parámetros reproductivos.

Resultados

Los bioensayos dosis-respuesta mostraron ajuste en cuanto a las respuestas obtenidas sobre los parámetros reproductivos evaluados *in vitro* (Cuadros 1 y 2). Los mejores resultados para el parámetro de inhibición del potencial reproductivo (CIPR), se observaron en las cepas Ma-M14J9, Ma-M26J1, BbM5J5, Ma-M12J15

y Ma-M1J15; en todos los casos, la CL 90 se alcanzó al emplear concentraciones menores a 37×10^6 conidios/ml.

Los resultados encontrados muestran que para alcanzar a inhibir la oviposición y el potencial reproductivo en un 90 % (CIO_{90} y $CIPR_{90}$), las cepas que mostraron el mejor desempeño en los bioensayos, no coinciden con las cepas que presentaron un mejor efecto sobre la inhibición de la postura de huevos. Sin embargo, la emergencia de larvas a partir de huevos provenientes de hembras que fueron tratadas con los hongos entomopatógenos se ve disminuida, de tal forma que el control sobre el desempeño reproductivo resulta considerable.

Discusión

Los resultados observados con las cepas prospecto son similares a los rangos de valores encontrados por otros autores en trabajos y condiciones similares (Guedes-Frazzon et al. 2000, Kaaya y Hassan 2000, Zhioua et al. 1997, Smith et al. 2000). Sin embargo, las concentraciones mínimas requeridas para inhibir tanto el potencial reproductivo (CIPR) como la oviposición (CIO) en un 99 %, se encontraron fuera del alcance de las concentraciones utilizadas en el presente ensayo. No obstante, al tratarse de un método de control biológico y no químico, los resultados encontrados para controlar el potencial reproductivo en un 90 %, resultan aceptables, más aún cuando la prueba utiliza garrapatas repletas, estadio en que son más tolerantes al menos al control químico. El testigo positivo empleado se comportó adecuadamente conforme a lo previamente establecido para esta cepa (Fernández et al. 2005).

Si bien es cierto que para suprimir la oviposición se requieren concentraciones de los entomopatógenos sumamente elevadas, la eclosión se ve afectada con las concentraciones utilizadas no permitiendo la emergencia de larvas infestantes de manera normal, obteniendo

Cuadro 1. Porcentaje de inhibición de la oviposición (CIO) y del potencial reproductivo (CIPR) de hembras repletas de una cepa de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* triple resistente, tratadas con diferentes cepas de *Beauveria bassiana*.

Cepa	Parámetro evaluado	Concentración ($\times 10^6$ conidios/ml)					CL ($\times 10^6$ con/ml)	
		50	25	12,5	6,25	3,125	50	90
Bb-M-13J15	CIO	36	40	26	22	13	107,1	23 442,3
	CIPR	86	79	57	34	15	10,2	54,9
Bb-M-14J18	CIO	46	48	45	39	45	95,5	ND
	CIPR	46	46	41	37	39	134,9	ND
Bb-M21J7	CIO	62	69	52	57	64	2,2	34 673,7
	CIPR	73	73	63	63	64	0,4	70 794,6
Bb-M-5J5	CIO	83	81	66	45	45	5,2	95,5
	CIPR	95	94	79	50	43	4,6	25,1

CL: concentración letal; ND: no determinado

Cuadro 2. Porcentaje de inhibición de la oviposición (CIO) y del potencial reproductivo (CIPR) de hembras repletas de una cepa de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* triple resistente, tratadas con diferentes cepas de *Metarhizium anisopliae*.

Cepa	Parámetro Evaluado	Concentración ($\times 10^6$ conidios/ml)					CL ($\times 10^6$ con/ml)	
		50	25	12,5	6,25	3,125	50	90
Ma-M6J19	CIO	62	35	18	28	18	6,4	1 230,3
	CIPR	65	34	16	20	7	2,4	109,6
Ma-M26J1	CIO	94	81	70	76	59	2,0	46,8
	CIPR	96	86	83	85	72	0,6	24,5
Ma-M12J15	CIO	81	91	75	63	44	3,8	47,8
	CIPR	91	91	76	68	50	2,9	33,1
Ma-M5J15	CIO	50	61	74	55	43	3,3	122,0
	CIPR	82	77	79	68	48	8,3	602,6
Ma-M18J18	CIO	50	64	45	49	35	3,3	122,0
	CIPR	63	73	52	51	35	2,5	229,1
Ma-M14J9	CIO	92	88	82	74	63	1,4	33,9
	CIPR	94	94	89	85	73	0,6	15,1
Ma-M1J15	CIO	75	86	54	58	30	6,9	81,3
	CIPR	91	91	66	65	36	4,7	36,3
Ma-M5J18	CIO	61	34	23	34	42	31,6	3 548,1
	CIPR	78	51	40	44	40	11,5	1 071,5
Ma-14J13	CIO	56	56	47	24	52	16,2	3 890,4
	CIPR	85	77	66	38	73	4,1	75,8
Ma-M4J9	CIO	62	35	18	28	18	39,8	1 230,3
	CIPR	65	34	16	20	7	36,3	346,7

CL: concentración letal

un control aceptable sobre este parámetro. Este hecho es importante resaltarlo debido a que al tratarse de un control no químico, el resultado encontrado muestra el potencial que presentan

los micoixodidas en el control de garrapatas multiresistentes, lo cual responde en su medida a las actuales demandas que hay para combatir a esta plaga de la ganadería, sin menoscabo de

los acaricidas químicos con los que podrían ser combinados y usados estratégicamente no sólo contra garrapatas (Pachamuthu et al. 1999).

Los bioensayos realizados demuestran que el desempeño de las cepas experimentales es variable, representando los mejores prospectos encontrados una herramienta potencial indispensable para futuros experimentos a realizar sobre bovinos infestados en forma artificial en estudios de establo y naturalmente infestados en estudios de campo.

No obstante que la aplicación de métodos de control no químico es una tendencia actual como parte del Manejo Integrado de Plagas, se requiere realizar ensayos a nivel de campo que permitan desafiar bajo condiciones multifactoriales, formulaciones de hongos entomopatógenos (micoixodidas) que demuestren su viabilidad para el control de garrapatas en condiciones naturales. Esta característica particular resalta la importancia de ampliar este tipo de pruebas a regiones en donde se está aplicando el combate químico contra una plaga, ya que nos permite establecer estrategias de control y organizar los recursos disponibles de una forma más adecuada.

Por último, es importante señalar que las posibles implicaciones de los resultados encontrados en el presente trabajo, podrían involucrar tanto garrapatas como otras especies de parásitos y formas de utilización (de Souza-Basso et al. 2005, Kanga et al. 2003).

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente ensayo muestran que las cepas Ma-M14J9, Ma-M26J1, Ma-M12J15, Ma-M1J15 de *M. anisopliae* y Bb-M5J5 de *B. bassiana* tienen acción patógena para hembras repletas de la cepa de *R. (B.) microplus* triple resistente y presentan potencial para el control biológico de garrapatas del ganado.

Agradecimientos

El presente experimento fue parcialmente financiado por el fondo sectorial SAGARPA-CONACYT 2002 CO1-1925.

Referencias

- DE CASTRO J. 1997. Sustainable tick. *Veterinary Parasitology* 71: 77-97.
- DE SOUZA-BASSO LM, MONTEIRO CA, DE ANDRADE-BELO MA, SOARES-EDESIO V, VALERIO-GARCÍA M, ALVES-MOCHI D. 2005. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40(6): 595-600.
- DRUMMOND RO, GRAHAM OH, ERNEST SE. 1967. Evaluation of insecticides for the control of *B. annulatus* (Say.) and *B. microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae) on cattle. *Proceedings of the 2nd International Congress of Acarology* 493-498.
- DRUMMOND RO, WHETSTONE TM. 1969. Oviposition of the gulf coast tick. *Journal of Economic Entomology* 63: 1547-1551.
- FERNÁNDEZ RM, ZHIOUA E, GARCÍA VZ. 2005. Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Boophilus microplus* sensible y resistente a los organofosforados. *Técnica Pecuaria en Mexico*. 43(3): 433-440.
- GUEDES-FRAZZON PA, JUNIOR PI, MASUDA A, SCHRANCK A, HENNING VM. 2000. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* (94): 117-125.
- HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ VM, HUNTER DM, BARRIENTOS LOZANO L, LEZAMA GUTIÉRREZ R, REYES VILLANUEVA F. 2003. Susceptibility of *Schistocerca piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) to *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Deuteromycotina: Hyphomycetes): laboratory and field trials. *Journal of Orthoptera Research* 12(1): 89-92.
- KAAYA GP, HASSAN S. 2000. Entomogenous fungi as promising biopesticide for tick control. *Experimental and Applied Acarology* 24: 913-926.
- KANGA BHL, JONES AW, JAMES R. 2003. Field trial using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* to control the ectoparasitic mite *Varroa destructor* in honey bee *Apis mellifera* colonies. *Journal of Economic Entomology* 96(4): 1091-1099.

- KUNZ SE, KEMP DH. 1994. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Revue scientifique et technique* 13(4): 1249-1286.
- LEORA SOFTWARE. 2002. *PoloPC*. Berkeley, California USA. <http://www.leorasoftware.com/>
- NÚÑEZ JM. 1985. *Boophilus microplus* the common cattle tick. Springer Verlag, Berlin. Germany. 204 pp.
- PACHAMUTHU P, KAMBLE ST, YUEN GY. 1999. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina; Hyphomycetes) Strain ESC-1 to the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) and its compability with insecticides. *Journal of Economic Entomology* 92(2): 340-346.
- SHELTON D, KARNS JJ. 1988. Coumaphos degradation in cattle-dipping vats. *Food Chemistry* 36: 831-834.
- SMITH EK, WALL R, FRENCH PN. 2000. The use of entomopathogenic fungi for the control of parasitic mites, *Psoroptes* spp. *Veterinary Parasitology* 92: 97-105.
- ZHIOUA EM, BROWNING PW, JOHNSON H, GINSBERG S, LEBRUN RA. 1997. Pathogenicity of the entomopatopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitology* 83: 815-818.

