

Comunicación corta

**Efectividad de *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Metsch.) Sorokin sobre huevos y neolarvas de *Rhipicephalus microplus* Canestrini**

***Efectivity of Metarhizium anisopliae sensu lato (Metsch.) Sorokin on eggs and larvae of Rhipicephalus microplus Canestrini***

Irma García Cruz, Elio M Del Pozo Núñez, Giselle Arteaga Casamayor, Yanira Herrera López

Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana. Autopista Nacional km 23½. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo-e: irma@unah.edu.cu

Recibido: 25/octubre /2016 Aceptado: 14/diciembre/2016

**Resumen:** El trabajo se realizó con el objetivo de determinar la efectividad *in vitro* del aislado Ma-005 de *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Metsch.) Sorokin sobre huevos y neolarvas de *Rhipicephalus microplus* Canestrini. Se evidenció un marcado efecto de la concentración de conidios en la suspensión sobre la eclosión de huevos, que resultó muy baja (menos del 10%) en la mayor de las concentraciones utilizadas, y sobre la mortalidad de las neolarvas de la garrapata, que fue superior al 80% en la concentración de  $10^8$  conidios.mL<sup>-1</sup>.

Palabras claves: *Rhipicephalus microplus*, *Metarhizium anisopliae*, garrapata, ganado bovino

**Abstract:** These work was carried out in the Plant Protection Laboratory of the Agronomy Faculty in the Agrarian University of La Habana, Cuba, to determinate the *in vitro* effectivity of the isolate Ma-005 of *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Metsch.) Sorokin on eggs and neolarvae of *Rhipicephalus microplus* Canestrini. It was observed a high effect of the conidia concentration on hatching of larvae from eggs, less than 10% at the highest of the concentrations evaluated, and the mortality of the tick neolarvae, more than 80% at the concentration of  $10^8$  conidia.ml<sup>-1</sup>.

Key words: *Rhipicephalus microplus*, *Metarhizium anisopliae*, tick, bovine cattle

Por las pérdidas que ocasiona, y su gran capacidad de adaptación y propagación en las regiones tropicales y subtropicales con diferencias en su comportamiento biológico, *Rhipicephalus microplus* Canestrini es considerado el ectoparásito más perjudicial al ganado bovino a nivel mundial. (Valdez et al. 2014, Yessinou et al. 2016). Dicho ectoparásito provoca lesiones locales que deterioran la piel y propician infecciones por microorganismos, pérdidas de sangre, daños por toxinas provocadas por él y transmisión de enfermedades (Nápoles et al. 2013).

El principal método de control de las garrapatas se basa en la aplicación de acaricidas químicos sobre las diferentes fases de vida parasitaria de estos hematófagos (Balladares et al. 2014, Moncada et al. 2015). El uso continuo de estos productos químicos ha provocado efectos secundarios sobre el medio ambiente, los animales y el hombre y podría inducir resistencia química o tolerancia en algunas poblaciones de garrapatas (Domínguez et al. 2016).

En Cuba, se ha generalizado el método de control integrado contra *R. microplus* que incluye la inmunización con la vacuna GAVAC y los baños con acaricidas; no obstante, existen informes de la resistencia desarrollada frente a los acaricidas de síntesis, por lo que se hace necesario replantear las estrategias para su control utilizadas actualmente. Dichas estrategias incluyen la aplicación de vacunas antigarrapatas y hongos entomopatógenos (Nápoles et al. 2013).

Los hongos constituyen los agentes de control biológico más versátiles debido al amplio rango de hospedantes y por su distribución cosmopolita (Rai et al. 2014). *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Metsch) Sorokin, es considerado la segunda de las especies benéficas con las que más se ha trabajado en todo el mundo para conseguir su producción masiva y su comercialización como bioplaguicida (Jitendra et al. 2012). Bajo condiciones de laboratorio y de campo, dicha especie ha sido informada como patogénica sobre *R. microplus* (Veríssimo 2013, Valdez et al. 2014).

La investigación que ahora se presenta se realizó en el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Agronomía. Allí se conserva el aislamiento autóctono de *M. anisopliae* (Ma-005) tomado de muestras de suelo en un campo cultivado de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) perteneciente a la finca «El Guayabal», ubicada en el municipio San José de las Lajas, provincia Mayabeque. En el estudio referido se utilizó, además, *Lecanicillium lecanii* Zare y Gams, cepa Y-57 a una concentración de  $1.6 \times 10^8$  conidios  $\times \text{mL}^{-1}$ , producida en Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos. Dicha especie se aplicó como control por existir antecedentes de que fuera efectiva en tratamientos contra la garrapata.

Para la realización de los ensayos se recolectaron adultos de *R. microplus* ingurgitados por vacas de la raza Holstein procedentes de la finca «El Jobo», ubicada en el municipio Caimito, de la provincia Artemisa. Dichos ejemplares no habían recibido tratamiento biológico. Ya en el laboratorio, las garrapatas se colocaron en placas Petri hasta la puesta de los huevos. A los 5-7 días fueron inoculados por inmersión con una suspensión conidial de *L. lecanii* cepa Y-57 a una concentración de  $1.6 \times 10^8$  conidios  $\times \text{mL}^{-1}$  y con el aislamiento Ma-005 de *M. anisopliae* con las concentraciones siguientes:  $1.1 \times 10^8$ ,  $1.1 \times 10^7$ ,  $1.1 \times 10^6$ ,  $1.1 \times 10^5$ ,  $1.1 \times 10^4$  y  $1.1 \times 10^3$  conidios  $\times \text{mL}^{-1}$ , durante un minuto. Posteriormente, 20 a 25 de ellos se colocaron en frascos de vidrio de 30 mL tapados con cinta de laboratorio (Parafilm «M»<sup>®</sup>) perforada con una aguja fina con el propósito de permitir el intercambio gaseoso.

A los 30 días se determinó el porcentaje de huevos eclosionados. Igualmente, se estableció la efectividad sobre neolarvas de *R. microplus*. Los procedimientos para el montaje, incubación y procesamiento de los datos fueron similares a los descritos en el ensayo anterior, exceptuando el hecho de que las neolarvas tenían 7-10 días, y la evaluación del porcentaje de mortalidad se realizó a los 14. El criterio de mortalidad de estas reveló que al ser estimuladas con un pincel no se movían.

Para la realización de los dos ensayos descritos se utilizó un diseño completamente aleatorizado con ocho tratamientos y cuatro repeticiones. Los resultados obtenidos fueron transformados según la expresión  $\text{asen}(p)^{1/2}$ , y procesados mediante un análisis de varianza de clasificación simple comparándose las medias a través de la prueba de Tukey con un nivel de significación del 5% (SAS Institute 2009).

Los análisis estadísticos mostraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos. El menor porcentaje de huevos eclosionados se registró en la mayor concentración del aislamiento Ma-005 a  $1.1 \times 10^8$  conidios. $\text{mL}^{-1}$  obteniéndose un valor de 9.93%. Ello no difiere de lo sucedido con la cepa de *L. lecanii* a la concentración de  $1.6 \times 10^8$  conidios. $\text{mL}^{-1}$ . El valor obtenido fue de 10.41%. El mayor porcentaje de huevos eclosionados se evidenció en la menor concentración del aislamiento Ma-005 sin apreciarse diferencias significativas respecto del control. En el caso de las neolarvas se evidenció que, a los 14 días, la mortalidad causada por *M. anisopliae* a la mayor concentración no mostró diferencias con la siguiente (81.80%) y con la cepa de *L. lecanii*, pero sí

difirió de los restantes tratamientos. Los valores obtenidos con la menor concentración del aislamiento Ma-005 sí mostraron diferencias en relación con el resto de los tratamientos (Tabla 1).

Sobre los huevos y neolarvas infectados se desarrolló un micelio profuso, de color blanco, que con el proceso de esporulación se tornó verde oliváceo.

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Lonc et al. (2014). Dichos investigadores informaron que las mayores concentraciones de hongos entomopatógenos propician que una mayor cantidad de conidios se adhieran a la cutícula de la garrapata, aumentando con ello la probabilidad de que propágulos infectivos penetren y se multipliquen dentro del cuerpo de estas, ocasionándoles daño, deficiencias nutricionales o liberación de toxinas que disminuyan su supervivencia.

Rodríguez et al. (2014) también obtuvieron buenos resultados en el tratamiento de larvas y huevos de *R. microplus* al utilizar *M. anisopliae*. Por su parte, Angelo et al. (2010) indican que *L. lecanii* tiene potencial para controlar huevos y neolarvas de *R. microplus* en condiciones de laboratorio. En escenarios iguales, Alemán et al. (2015) demostraron que los hongos causan mortalidad en las diferentes fases evolutivas de este ectoparásito, y ocasionan una disminución de la tasa de eclosión de los huevos parasitados. Narladkar et al. (2015) también informaron sobre el gran efecto ovicida de *M. anisopliae*.

Tabla 1. Efecto de la concentración de conidios del aislamiento Ma-005 de *M. anisopliae* sobre huevos y neolarvas de *R. microplus*, en condiciones de laboratorio.

Concentración (conidios.mL <sup>-1</sup> )	Huevos eclosionados (%)		Mortalidad de neolarvas (%) (14 días)	
	X orig.	X. transf.	X orig.	X. transf.
Control	97.04	0.5167 a	4.36	0.2444 e
L1 1.6 x 10 <sup>8</sup>	10.41	0.2692 f	80.27	0.4760 a
Ma 1.1 x 10 <sup>8</sup>	9.93	0.2672 f	81.80	0.4803 a
Ma 1.1 x 10 <sup>7</sup>	28.23	0.3319 e	69.52	0.4496 ab
Ma 1.1 x 10 <sup>6</sup>	45.32	0.3841 d	52.69	0.4047 bc
Ma 1.1 x 10 <sup>5</sup>	58.91	0.4220 c	43.75	0.3789 c
Ma 1.1 x 10 <sup>4</sup>	71.97	0.4557 b	38.59	0.3611 c
Ma 1.1 x 10 <sup>3</sup>	91.39	0.5033 a	21.07	0.3083 d
C.V. (%)		4.56		8.35
ESx		0.009***		0.016***

Medias con letras iguales, no difieren significativamente, según Tukey (p≤ 0.05).

## Conclusiones

Los resultados obtenidos apuntan a que *Metarhizium anisopliae* pudiera ser un agente de control biológico prometedor para el control de la garrapata del ganado bovino.

## Referencias bibliográficas

Alemán Y, Montano M, Infante D, Martínez B (2015) Cepas de *Lecanicillium lecanii* promisorias para el control biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Revista Protección Vegetal 30 (Número Especial):95

- Angelo C, Fernandes Avertton K, Bahiense C, Perinotto M, Moraes A, Terra M, Bittencourt R (2010) Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology* 172(4):317-322. doi: 2010.04.038
- Balladares P, Bautista A, Pozo C, Pimentel R (2014) Control Biológico de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* con *Metarhizium anisopliae*. IX Congreso de Biotecnología. Palenque, Chiapas:56 p
- Domínguez OM, Oliva MA, Aguilar G, Mendoza P, Ruiz B, Bautista GU, Culebro JM, Gutiérrez FA (2016) Evaluation of *Beauveria* sp. strains, conidial concentration and immersion times on mortality rate of bovine tick (*Boophilus* sp.) *Journal of Applied Biology and Biotechnology* 4 (4): 64-68. doi:10.7324/JABB.2016.40407
- Jitendra M, Kiran D, Ambika K, Priya S, Neha K, Sakshi D (2012) Biomass Production of Entomopathogenic Fungi using various Agro Products in Kota Region, India. *International Research Journal of Biological Sciences* 1(4):12-16.
- Lonc E, Guz-Regner K, Kiewra D, Szczepanska A (2014) Insight into tick biocontrol with special regard to fungi. *Annals of Parasitology* 60(3):169-177.
- Moncada AC, David Villar D, Chaparro JJ, Angulo J, Mahecha ML (2015) Aproximación al uso de hongos entomopatógenos y vacunas para el control sostenible de garrapatas en sistemas ganaderos: Revisión. *Avances en Investigación Agropecuaria* 19(3):55-71
- Nápoles D, Sebasco K, Guerra Y, Mencho J (2013) Eficacia de tres ectoparasiticidas frente a *Rhipicephalus microplus*. *Revista Producción Animal* 25(1):1-5
- Narladkar BW, Shivpuje PR, Harke PC (2015) Fungal Bio-Control Agents for Integrated Management of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Ticks. *Indian Veterinary Journal* 92(5):34 – 37
- Rai D, Updhyay V, Mehra P, Rana M, Pandey AK (2014) Potential of Entomopathogenic Fungi as Biopesticides. *Indian Journal of Science Research and Technology* 2(5):7-13
- Rodríguez UJ, Rodríguez RI, Ojeda MM, Galindo E, Lezama R (2014) Eficacia de la mezcla de dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) para el control de *Rhipicephalus microplus* en infestaciones naturales en bovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 17:223-229
- SAS Institute (2009) SAS/STAT User's Guide. Version 9.3th. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Valdez E, Gutiérrez E, Vargas M, Lezama R, Juárez A, Salas G-Razo (2014) Eficacia de *Metarhizium anisopliae* en garrapatas *Rhipicephalus microplus* en Indaparapeo y Tzitzio, Michoacán. *Entomología Mexicana* 1:321-325
- Veríssimo C (2013) Controle biológico do carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia* 11(1):14-23
- Yessinou RE, Akpo Y, Adoligbe C, Adinci J, Assogba MN, Koutinhoun B, Karim IY, Farougou S (2016) Resistance of tick *Rhipicephalus microplus* to acaricides and control strategies. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 4(6):408-414