

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Eficacia de *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Metsch.) Sorokin sobre *Rhipicephalus microplus* Canestrini

Effectivity of *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Metsch.) Sorokin on *Rhipicephalus microplus* Canestrini

Irma García Cruz^{1*}, Elio Minel Del Pozo Núñez¹, Giselle Arteaga Casamayor¹

¹Universidad Agraria de La Habana, Carretera a Tapaste y Autopista Nacional km 23 ½, San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba, CP 32700

E-mail: irma@unah.edu.cu

RESUMEN

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de la Habana, con el objetivo de determinar la eficacia *in vitro* del aislado Ma-005 de *Metarhizium anisopliae* s.l. (Metsch.) Sorokin sobre huevos y neolarvas de *Rhipicephalus microplus* Canestrini. Huevos de cinco a siete días y neolarvas de siete a 10 días, fueron inoculados por inmersión durante un minuto en suspensiones con diferentes concentraciones de conidios del aislado y se evaluó la eclosión de los huevos a los 30 días y la mortalidad de las neolarvas a los siete y 14 días. 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. La mortalidad de las neolarvas de la garrapata fue superior al 80% en la concentración de 10⁸ conidios mL⁻¹.

Palabras clave: ectoparásito, garrapata, hongos entomopatógenos

ABSTRACT

These work was carried out in the Plant Protection Laboratory of the Agronomy Faculty in the Agrarian University of La Habana, to determinate the *in vitro* effectivity of the isolate Ma-005 of *Metarhizium anisopliae* s.l. (Metsch.) Sorokin on eggs and neolarvae of *Rhipicephalus microplus* Canestrini. Eggs, with five to seven days old, and neolarvae with seven to 10 days old, were inoculated by immersion during one minute in suspensions with different conidial concentration of the isolate. It was evaluated the hatching of larvae from eggs after 30 days and neolarval mortality after seven and 14 days. 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 10⁸ conidia mL⁻¹.

Keywords: ectoparasite, ticks, entomopathogenic fungi

INTRODUCCIÓN

Rhipicephalus microplus Canestrini es considerado el ectoparásito más importante del ganado bovino a nivel mundial, por las pérdidas que ocasiona y su gran capacidad de adaptación y propagación en regiones tropicales y subtropicales con diferencias en su comportamiento biológico (Valdez et al., 2014; Yessinou et al., 2016). Provoca lesiones locales que deterioran la piel y propician infecciones por microorganismos, pérdidas de sangre, daños por toxinas provocadas por el parásito 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 indiscriminado de estos productos químicos ha generado consecuencias desfavorables y efectos secundarios sobre el medio ambiente, los animales y el hombre y además, podrían 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 resistencia desarrollada frente a los acaricidas de síntesis, por lo que se hace necesario replantear las estrategias utilizadas para su control. Las 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 su distribución cosmopolita (Rai et al., 2014). La especie de *Metarhizium anisopliae* sensu lato (Metsch) Sorokin, es considerado como la segunda con la que más se ha trabajado en todo el mundo en relación con su producción masiva y comercialización como bioplaguicidas (Jitendra et al., 2012). Ha sido informada como patogénica sobre *R. microplus* bajo condiciones de laboratorio y de campo (Veríssimo, 2013; Valdez et al., 2014).

Teniendo en cuenta lo anterior se propuso la realización del presente trabajo con el objetivo de determinar la eficacia *in vitro* sobre huevos y neolarvas de *R. microplus* del aislado Ma-005 de *M. anisopliae s. l.*

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Agronomía donde se conserva el aislado de *M. anisopliae* (Ma-005) obtenido de muestras de suelo en un campo cultivado de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) de la finca “El Guayabal” ubicada en el municipio San José de las Lajas, provincia Mayabeque. Además, se utilizó como control *Lecanicillium lecanii* Zare y Gams, cepa Y-57 (L1) a una concentración de $1,6 \times 10^8$ conidios $\times \text{mL}^{-1}$, utilizada en los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE).

Eficacia biológica del aislado Ma-005 de *M. anisopliae* sobre huevos de *R. microplus*

Para el ensayo se recolectaron hembras ingurgitadas de *R. microplus* de vacas de la raza Holstein en la finca “El Jobo” en la provincia Artemisa, municipio Caimito, que no habían recibido tratamiento biológico. En el laboratorio, las garrapatas se colocaron en placas de Petri hasta la puesta de los huevos, pasado de cinco a siete días fueron inoculados por inmersión durante un minuto en suspensiones conidiales del aislado 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 mL^{-1} , y con *L. lecanii* cepa Y-57 a una concentración de $1,6 \times 10^8$ conidios mL^{-1} , posteriormente se colocaron de 20 a 25 de ellos en frascos de vidrio de 30 mL tapados con cinta de laboratorio (Parafilm “M”®) perforada con una fina aguja para permitir el intercambio gaseoso.

A los 30 días se evaluó el número de huevos eclosionados y determinó el porcentaje de los mismos. 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).

Eficacia biológica del aislado Ma-005 de *M. anisopliae* sobre neolarvas de *R. microplus*

Los procedimientos utilizados para el montaje, incubación y procesamiento de los datos fueron similares a los descritos en el ensayo anterior, excepto que las neolarvas tenían de siete a 10 días y la evaluación del porcentaje

de mortalidad se realizó a los siete y 14 días. El criterio de mortalidad de dichas neolarvas fue que al ser estimuladas con un pincel no se movían.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Eficacia biológica del aislado Ma-005 de *M. anisopliae* sobre huevos de *R. microplus*

El análisis estadístico realizado muestra diferencias altamente significativas entre los tratamientos. El menor porcentaje de huevos eclosionados se registró en la mayor concentración del aislado Ma-005 a $1,1 \times 10^8$ conidios mL^{-1} obteniendo un valor 9,93% no difiriendo de la cepa de *L. lecanii* a la concentración de $1,6 \times 10^8$ conidios mL^{-1} con un valor de 10,41%, el mayor porcentaje de huevos eclosionados se evidenció en la menor concentración del aislado Ma-005 sin diferencias significativas con el control (Tabla 1).

Alemán *et al.* (2015) demostraron que los hongos utilizados causan mortalidad en las diferentes fases evolutivas del ectoparásito, y ocasionan una disminución de la tasa de eclosión en los huevos parasitados. También, Narladkar *et al.* (2015) informaron el gran efecto ovicida de *M. anisopliae*.

Eficacia biológica del aislado Ma-005 de *M. anisopliae* sobre neolarvas de *R. microplus*

Los análisis estadísticos muestran que existen diferencias altamente significativas en los momentos evaluados. En la Tabla 2, se observa que a los siete días la mortalidad es mayor en la concentración más alta de $1,1 \times 10^8$ del aislado Ma-005 obteniéndose un 55,76 %, no difiriendo de la cepa de *L. lecanii* a una concentración de $1,6 \times 10^8$

con valor de 57,21 % de mortalidad y difiriendo sobre el resto de los tratamientos de 10^7 a 10^3 . El menor porcentaje de mortalidad se evidenció en la menor concentración sin diferencia con el control. A los 14 días, con resultados similares se evidencia que la mayor concentración de *M. anisopliae* de 10^8 no mostró diferencias en la concentración siguiente y la cepa de *L. lecanii*, pero si difiriendo de los restantes tratamientos, por otra parte, el porcentaje menor de mortalidad se evidenció en la concentración más baja del aislado Ma-005, sin diferencia respecto al control.

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

Los resultados obtenidos concuerdan con Lonc *et al.* (2014) que refieren que las mayores concentraciones de hongos entomopatógenos poseen una mayor cantidad de conidios que se adhieren a la cutícula de la garrapata aumentando 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 la supervivencia. Rodríguez *et al.* (2014) demuestran buenos resultados sobre larvas y huevos de *R. microplus* utilizando *M. anisopliae*.

CONCLUSIONES

El aislado Ma-005 de *M. anisopliae* muestra una elevada eficacia sobre huevos y neolarvas de *R. microplus* en un grado que dependió de la concentración de conidios en la suspensión.

Tabla 1 - Efecto del aislado Ma-005 de *M. anisopliae* sobre huevos de *R. microplus*, en condiciones de laboratorio

Concentración (conidios mL^{-1})	Huevos eclosionados (%)	
	X orig.	X. transf.
Control	97,04	0,5167 a
LI $1,6 \times 10^8$	10,41	0,2692 f
Ma-005 $1,1 \times 10^8$	9,93	0,2672 f
Ma-005 $1,1 \times 10^7$	28,23	0,3319 e
Ma-005 $1,1 \times 10^6$	45,32	0,3841 d
Ma-005 $1,1 \times 10^5$	58,91	0,4220 c
Ma-005 $1,1 \times 10^4$	71,97	0,4557 b
Ma-005 $1,1 \times 10^3$	91,39	0,5033 a
C.V. (%)		4,56
ESx		0,009***

Medias con letras iguales, no difieren significativamente, según Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabla 2 - Efecto del aislado Ma-005 de *M. anisopliae* sobre neolarvas de *R. microplus*, en condiciones de laboratorio

Concentración (conidios mL ⁻¹)	Mortalidad (%)			
	7 días		14 días	
	X orig.	X. transf.	X orig.	X. transf.
Control	0,00	0,2255 e	4,36	0,2444 e
LI 1,6 x 10 ⁸	57,21	0,4162 a	80,27	0,4760 a
Ma-005 1,1 x 10 ⁸	55,76	0,4125 a	81,80	0,4803 a
Ma-005 1,1 x 10 ⁷	38,57	0,3643 b	69,52	0,4496 ab
Ma-005 1,1 x 10 ⁶	30,95	0,3400 bc	52,69	0,4047 bc
Ma-005 1,1 x 10 ⁵	21,00	0,3075 c	43,75	0,3789 c
Ma-005 1,1 x 10 ⁴	10,75	0,2705 d	38,59	0,3611 c
Ma-005 1,1 x 10 ³	6,30	0,2524 de	21,07	0,3083 d
C.V. (%)		6,92		8,35
ESx		0,011***		0,016***

Medias con letras iguales, dentro de cada columna, no difieren significativamente, según Tukey ($p \leq 0,05$)

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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, 56p.
- DOMÍNGUEZ, O.M., OLIVA, M.A., AGUILAR, G., MENDOZA, P., et al. 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.
- JITENDRA, M., KIRAN, D., AMBIKA, K., PRIYA, et al. 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, A.C., VILLAR, D., CHAPARRO, J.J., et al. 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, B.W., SHIVPUJE, P.R., HARKE, P.C. 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., et al. 2014. Potential of Entomopathogenic Fungi as Biopesticides. *Indian Journal of Science Research and Technology*, 2 (5): 7-13.
- RODRÍGUEZ, U.J., RODRÍGUEZ, R.I., OJEDA, M.M., et al. 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., *et al.* 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.
- YESSINO, R.E., AKPO, Y., ADOLIGBE, C., ADINCI, J., *et al.* 2016. Resistance of tick *Rhipicephalus microplus* to acaricides and control strategies. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4 (6): 408-414.

Recibido el 18 de junio de 2017 y aceptado el 17 de diciembre de 2018