



EFICACIA DE LA MEZCLA DE DOS CEPAS DE *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) PARA EL CONTROL DE *Rhipicephalus microplus* EN INFESTACIONES NATURALES EN BOVINOS

[EFFICACY THE MIXTURE OF TWO STRAINS OF *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) TO CONTROL *Rhipicephalus microplus* ON NATURAL INFESTATION OF CATTLE]

**Uriel Jesús Rodríguez-Alcocer^a, Roger Iván Rodríguez-Vivas^{a*},
Melina Maribel Ojeda-Chi^a, Edelmira Galindo-Velasco^b,
Roberto Lezama-Gutiérrez^b**

^a*Departamento de Salud Animal y Medicina Preventiva. Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán, Km. 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil, C.P. 97100, Mérida, Yucatán, México.*

e-mail: rvivas@uady.mx

^b*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima, A.P. 36, C.P. 28100, Tecomán, Colima, México.*

**Corresponding author*

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Rhipicephalus microplus* en ganado bovino infestado naturalmente. El estudio se realizó en una unidad de producción de ganado bovino ubicada en el trópico Mexicano. Se formaron dos grupos de 10 bovinos basado en el número de garrapatas *R. microplus* adultas y fases juveniles (larvas y ninfas). Los animales del grupo tratado (promedio de 73.4 y 27.5 garrapatas adultas y juveniles respectivamente) fueron asperjados con una mezcla de dos cepas de *M. anisopliae* (Ma14+Ma34) a una concentración de 1×10^8 conidios/ml. El grupo control (promedio de 77.7 y 24.7 garrapatas adultas y juveniles respectivamente) fue asperjado con agua+Tween80. Cada grupo recibió cuatro aplicaciones cada 14 días. En los días 0, 3, 5, 7 y 14 post-tratamiento se contó el número de garrapatas *R. microplus* adultas y fases juveniles. A partir de la primera aplicación del tratamiento hasta la última, los animales del grupo tratado presentaron una disminución ($P < 0.05$) en el número de garrapatas *R. microplus* adultas (30.9-87 %) y fases juveniles (35.8-72 %). Estos resultados demuestran que el tratamiento repetido con la mezcla de las cepas Ma14+Ma34 de *M. anisopliae* puede ser empleado como una alternativa para el control de infestaciones naturales de *R. microplus* en ganado bovino del trópico mexicano.

Palabras clave: *Metarhizium anisopliae*; Hongos; Entomopatógeno; *Rhipicephalus microplus*; Control biológico; Bovino.

SUMMARY

The objective of the present study was to evaluate the efficacy of *Metarhizium anisopliae* on the control of *Rhipicephalus microplus* in cattle infested naturally in the Mexican tropics. The study was carried out on a ranch in the Mexican tropics. Base on the number of adult and immature (larvae and nymphs) *R. microplus* ticks 20 steers were assigned into two groups of 10 cattle. Animals in the treated group (average of 73.4 y 27.5 adult and immature ticks respectively) were sprayed with a mixture of Ma14+Ma34 of *M. anisopliae* at a concentration of 1×10^8 conidios/ml. The other group remained as untreated control (average of 77.7 y 24.7 adult and immature ticks respectively) and treated with water+Tween 80. Each group received 4 applications every 14 days. Adult and immature stages of ticks were recorded on days 0, 3, 5, 7 and 14 post-treatment. From the first application treatment to the end of the experiment, animals in the treated group had lower counts ($P < 0.05$) of adult (30.9-87 %) and immature (35.8-72 %) ticks. The results demonstrate the efficacy of repeated treatment with the strains Ma14+Ma34 of *M. anisopliae* can be used as an alternative to control natural infestation of *R. microplus* on cattle in the Mexican tropics.

Key words: *Metarhizium anisopliae*; fungi; entomopathogenic; *Rhipicephalus microplus*; Biological control; Cattle.

INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) es el ectoparásito que produce mayores pérdidas económicas en el trópico y subtropico mexicano, debido a los altos costos asociados al control y a las enfermedades que trasmite (Rodríguez-Vivas et al., 2005). En México, el control de *R. microplus* se basa principalmente en el uso de antiparasitarios tales como: Organofosforados, Piretroides sintéticos, Amidinas y Lactonas macrocíclicas. Sin embargo, el uso continuo de antiparasitarios ha propiciado el desarrollo de poblaciones de garrapatas resistentes, con amplia distribución mundial, incluyendo a México (Rodríguez-Vivas et al., 2011). Esto ha propiciado la necesidad de buscar alternativas no químicas de control de garrapatas que no afecten al ambiente y a la salud de los humanos (Fernández-Ruvalcaba et al., 2005; Rodríguez-Vivas et al., 2006, 2007).

Entre los métodos de control no químicos se encuentran la selección de razas de bovinos resistentes, vacunas antigarrapatas, manejo de praderas y el control biológico (Rodríguez-Vivas et al., 2005; Ojeda-Chi et al., 2010). El control biológico basado en el uso de hongos entomopatógenos ha demostrado buena eficacia para el control de varios géneros de garrapatas, entre los que se encuentran *Amblyomma* y *Rhipicephalus* (Fernandes y Bittencourt, 2008). Las especies de hongos entomopatógenos que han demostrado eficacia contra garrapatas son *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*) y *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*), siendo *B. bassiana* y *M. anisopliae* las especies más estudiadas y las que han demostrado mayor eficacia contra garrapatas (Ojeda-Chi et al., 2010, 2011; Fernandes et al., 2012).

En condiciones *in vitro* e *in vivo* *M. anisopliae* ha demostrado eficacias que van de 50-100 % para el control de todas las fases de desarrollo de *R. microplus*, afectando su índice reproductivo, longevidad, eclosión, entre otros: La eficacia de *M. anisopliae* puede variar dependiendo de la cepa, virulencia y condiciones de temperatura y humedad ambiental (Fernandes y Bittencourt, 2008; Polar et al., 2008; Ojeda-Chi et al., 2011; Fernandes et al., 2012).

En México, la cepa Ma34 de *M. anisopliae* ha demostrado ser eficaz para el control de fases adultas de *R. microplus* en condiciones *in vitro* (100 % de eficacia, Ojeda-Chi et al., 2010) e *in vivo* sobre bovinos (40-90 % de eficacia, Alonso-Díaz et al., 2007). La cepa Ma14 y la mezcla de las cepas Ma14+Ma34 han demostrado tener mejor eficacia

para el control de larvas de *R. microplus* en condiciones *in vitro* y en praderas (Ojeda-Chi et al., 2010); sin embargo, la mezcla de ambas cepas para el control simultáneo de las fases adulta y juveniles (larvas y ninfas) de *R. microplus* en bovinos no ha sido probada. Por tal motivo el objetivo del presente estudio es evaluar la eficacia de la mezcla de las cepas Ma14+Ma34 de *M. anisopliae* para el control de *R. microplus* sobre fases adulta y juveniles en ganado bovino infestado naturalmente en el trópico mexicano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio se realizó en una unidad de producción de ganado bovino ubicada en el municipio de Tizimín, Yucatán, México. El clima de la región es tropical sub-húmedo con lluvias en verano. La temperatura máxima fluctúa entre 35 °C y 40 °C (con una media de 26.6 °C). La humedad relativa (HR) varía de 65-100 % (media de 80 %) y precipitación pluvial de 1290 mm al año (INEGI, 2002). El estudio se realizó de mayo a julio de 2011.

Cepas de *Metarhizium anisopliae* y condiciones de cultivo

Las cepas Ma34 y Ma14 provienen de la colección de hongos entomopatógenos de la Universidad de Colima, México. Los hongos fueron cultivados en agar dextrosa Sabouraud (Moorhouse et al., 1993), con 500ppm de cloranfenicol (Sneh, 1991) y se incubó durante 3 semanas a 25±1 °C y 70 % de humedad relativa (Barson et al., 1994). Los conidios fueron extraídos y suspendidos en agua estéril con Tween 80 (0.1 %) y posteriormente colocadas en tubos de vidrio y homogenizadas con un vortex. La concentración de los conidios fue determinada mediante un hemocitómetro de Neubauer para obtener una concentración de 1x10⁸ conidios/ml, la cual se diluyó en 0.1 % de Tween 80. Para determinar la viabilidad de las colonias se colocó 100 µl de la suspensión en agar dextrosa Sabouraud y se incubó a 25±1 °C y 70 % de humedad relativa (Barson et al., 1994). A las 48 horas se evaluó la viabilidad de las esporas (esporulación, crecimiento vegetativo y germinación de los conidios) (Lacey et al., 1994).

La producción masiva de cada cepa de *M. anisopliae* se realizó de manera independiente en bolsas de polipropileno de alta densidad con 200g de arroz. Previamente el arroz fue remojado en agua destilada conteniendo 500 ppm de cloranfenicol durante 40 minutos y esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 minutos a 1.4 libras/presión. Cada bolsa fue inoculada con 10 ml del hongo a una concentración

de 1×10^8 conidios/ml usando una aguja estéril (la punción fue sellada) y posteriormente incubadas durante 21 días a 25 °C, 12 horas luz- oscuridad (Lezama y Murguía, 1990). Posteriormente los conidios se cosecharon mediante lavado de los arroces con Tween 80, filtrados y centrifugados a 3600 g por 15 minutos, conservando los conidios en polvo y a temperaturas (4 °C) de refrigerador hasta su uso.

Estudio de campo

Para este estudio se emplearon 20 bovinos hembras *Bos taurus* x *Bos indicus*, cuyas edades fluctuaron entre 9 y 12 meses de edad y con un peso promedio de 220 a 250 kg de peso vivo. Los animales realizaron pastoreo nocturno, con duración de 12 horas, en praderas con gramíneas (*Panicum maximum*, *Cynodon nlemfuensis*) y leguminosas (*Leucaena leucocephala*), y recibieron agua y sales minerales *ad libitum*; durante el día permanecían estabulados en los corrales. Asimismo, recibieron suplemento alimenticio a razón de 1 % del peso vivo del animal. Todos los bovinos fueron llevados a potreros con infestaciones naturales de garrapatas (Arieta-Roman *et al.*, 2010) sin recibir tratamiento acaricida por un período de 45 días previos al experimento.

Al día 0 se realizó un conteo de garrapatas en las fases adulta y juveniles (larvas y ninfas) siguiendo las técnicas descrita por Wharton y Utech (1970) y Cen y Rodríguez (2003) respectivamente. Se determinó el número de garrapatas adultas y juveniles por animal para formar dos grupos homogéneos de 10 animales cada uno (promedios de 73.4 y 77.7 garrapatas adultas, así como 24.7 y 27.5 garrapatas juveniles). Los animales de cada grupo fueron identificados con aretes de distinto color y números correlativos.

La preparación del tratamiento consistió en una mezcla de dos cepas (Ma14+Ma34) de *M. anisopliae* a una concentración de 1×10^8 conidios/ml, empleando el 50 % del volumen final de cada cepa, las cuales fueron diluidas en una solución preparada con agua y Tween 80 al 0.1 % (1 ml Tween 80/1 litro de agua). Una vez obtenida la solución con el hongo, los animales del grupo tratado fueron asperjados empleando una bomba tipo mochila con una capacidad de 15 litros, usando un total de 5 litros de solución por animal. Los animales del grupo control fueron asperjados con agua y Tween 80 recibiendo 5 litros por animal. Cada grupo de animales fue asignado a 8 praderas realizando rotaciones cada tercer día.

El tratamiento se aplicó cada 14 días y el número de garrapatas adultas y juveniles se cuantificó los días 0, 3, 5, 7 y 14 postratamiento (PT) (Alonso *et al.*, 2007). La aplicación de los tratamientos se realizó a las 18:00

h para evitar la radiación solar y permitir una mayor persistencia y viabilidad de los conidios en el área aplicada (Polar *et al.*, 2005b, 2012). Para identificar alguna reacción adversa asociada al tratamiento, durante la aplicación de los hongos y días posteriores, todos los animales fueron inspeccionados físicamente para verificar la integridad de la piel y los posibles efectos en vías respiratorias.

Análisis estadístico

En cada evaluación, las garrapatas adultas y juveniles del grupo control y tratado fueron contabilizados y comparadas usando el modelo ANOVA de medidas repetidas para ver las diferencias a través del tiempo entre grupos (SAS, 2008). Se consideró un nivel de significancia de $P < 0.05$. Asimismo, la eficacia del tratamiento con *M. anisopliae* fue evaluada usando la fórmula descrita por Morin *et al.* (1996):

$$\% \text{Eficacia} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A = Media del grupo control.

B = Media del grupo tratado.

RESULTADOS

Durante el experimento no se identificaron daños en la piel y efectos adversos en vías respiratorias en los animales que recibieron tratamiento, permaneciendo físicamente sanos hasta la conclusión del mismo.

En la Tabla 1 se observa el número promedio de garrapatas adultas y la eficacia demostrada por la mezcla de las cepas Ma14+Ma34 del hongo *M. anisopliae* contra garrapatas adultas en infestaciones naturales. A partir de la primera aplicación del tratamiento hasta el final del experimento se encontró una disminución en el número de garrapatas en los animales del grupo tratado (de 73.4 a 2.2 garrapatas promedio por animal). Por otra parte, la eficacia se hizo notable desde el tercer día de la primera aplicación del tratamiento. A partir del día 7 de la segunda aplicación se observaron las mayores eficacias (44.0 a 87.7 %). Las diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en el número de garrapatas de *R. microplus* entre los grupos control y tratado se presentaron en los días 7 y 14 PT en la segunda, tercera y cuarta aplicación. En la Tabla 2 se presenta el número promedio y la eficacia de *M. anisopliae* sobre las fases juveniles de *R. microplus* en infestaciones naturales. Se encontró diferencia estadística ($P < 0.05$) a partir del día 7 PT de la primera aplicación de la mezcla del hongo (eficacia de 35.8 a 72 %). En la segunda y cuarta aplicación de la mezcla del hongo en todos días PT se encontró diferencias estadísticas significativas entre los grupos control y tratado.

Tabla 1. Promedio y eficacia de *Metarhizium anisopliae* (cepas Ma14+Ma34) sobre garrapatas adultas de *Rhipicephalus micropus* (4.5-8.0mm).

Tratamiento	Días de conteo	Tratamiento		Control		Eficacia	F
		Media ± DE	Rango	Media ±DE	Rango		
1	0	73.4 ± 20.7	44-98	77.7 ± 17.6	46-98	NA	1.38
	3	37.4 ± 13.4	22-56	58.8 ± 21.8	36-96	36.4*	2.64
	5	48.5 ± 16.9	16-70	54.5 ± 31.3	32-116	11.0	3.41
	7	48.5 ± 21.8	16-74	70.2 ± 28.9	42-116	30.9.*	1.76
	14	9.4 ± 3.9	2-14	11.7 ± 7.6	6-28	19.6	3.70
2	3	14.8 ± 2.7	10-18	20.5 ± 3.7	16-28	27.8	1.82
	5	15.1 ± 5.1	8-20	24.0 ± 5.4	16-30	37.0	1.10
	7	11.1 ± 4.2	4-18	25.1 ± 4.7	20-32	55.7*	1.21
	14	18.2 ± 9.2	4-26	32.5 ± 15.8	20-66	44.0*	2.91
3	3	12.2 ± 5.0	8-20	24.5 ± 12.3	16-52	50.2	5.90
	5	9.4 ± 4.7	2-14	17.4 ± 7.2	8-28	45.9	2.37
	7	2.2 ± 1.7	0-4	18 ± 2.3	14-20	87.7*	1.64
	14	5.1 ± 3.8	0-10	24.5 ± 5.6	16-30	79.1*	2.18
4	3	5.7 ± 4.2	0-10	14.5 ± 11.4	8-40	60.6	7.27
	5	5.7 ± 3.1	2-10	18.5 ± 9.6	10-38	69.2*	9.38
	7	2.5 ± 2.7	0-6	15.7 ± 7.3	10-30	84.0*	7.07
	14	9.4 ± 5.6	0-16	30.5 ± 9.7	18-44	69.1*	3.02

*Diferencia estadística $P < 0.05$ entre el grupo tratado y control en cada muestreo, DE: Desviación estándar, NA: No aplica

DISCUSIÓN

M. anisopliae es considerado uno de los agentes promisorios para el control biológico de garrapatas (Ojeda-Chi *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2012). En condiciones de laboratorio *M. anisopliae* ha demostrado ser eficaz para el control de las fases adulta y juveniles de *R. microplus*; en estudios previos la cepa Ma34 y la mezcla de Ma14+Ma34 presentaron 100 % de eficacia para el control de garrapatas adultas en condiciones *in vitro* (Ojeda-Chi *et al.*, 2010, 2011). En el presente estudio la mezcla de *M. anisopliae* presentó eficacias significativas estadísticamente que van de 30.9 a 87.7 % para el control de garrapatas adultas en infestaciones naturales de bovinos, siendo más evidente en los días 7 y 14 del segundo, tercer y cuarto tratamiento. Estos resultados son similares a los encontrados en Veracruz, México por Alonso-Díaz *et al.* (2007), quienes reportaron eficacias de 40 a 91 % empleando la cepa Ma34 de *M. anisopliae* sobre bovinos infestados con garrapatas adultas de *R. microplus*; sin embargo, en este estudio realizado en Veracruz no se evaluó la eficacia contra fases juveniles de garrapatas. Asimismo, Castro *et al.* (1997) y Polar *et al.* (2005a)

reportaron eficacias de >50 % a concentraciones de 1×10^8 , en ganado estabulado bajo infestaciones naturales. En otro estudio, Kaaya *et al.* (2011) asperjaron conidios de *M. anisopliae* en formulados de aceite para el control de *R. evertsi evertsi* y *R. decoloratus* en bovinos infestados artificialmente y mantenidos en el campo, encontraron una eficacia de > 70 %. Ojeda-Chi *et al.* (2011) mencionan que además de provocar la muerte de las garrapatas adultas, *M. anisopliae* reduce la oviposición, la masa de huevos y la eclosión de *R. microplus*, lo que presenta una buena alternativa como agente biocontrol. En el presente estudio se observó que el hongo tiene un efecto significativo a partir del día 7 PT en tres de los cuatro tratamientos. Este comportamiento es similar a los resultados de Ojeda-Chi *et al.* (2010) quienes encontraron que a partir del día 8 el hongo inicia su efecto entomopatógeno en garrapatas *R. microplus*. Arruda *et al.* (2005) reportaron que la invasión masiva de *M. anisopliae* se inicia a los 3 días de infección y la diseminación del hongo en los órganos de la garrapata se presenta generalmente a los 4 días de la infección, para posteriormente producir las primeras mortalidades por acciones físicas y enzimáticas tales como destruxinas y citocalacinas.

Tabla 2. Promedio y eficacia de *Metarhizium anisopliae* (cepas Ma14+Ma34) sobre garrapatas juveniles (larvas y ninfas) de *Rhipicephalus microplus*.

Tratamiento	Días de conteo	Tratamiento		Control		Eficacia	F
		Media \pm DE	Rango	Media \pm DE	Rango		
1	0	27.5 \pm 12.5	12 – 54	24.7 \pm 7.4	14 – 36	NA	2.79
	3	33.0 \pm 12.3	16 – 56	35.7 \pm 15.3	24 – 60	7.6	1.21
	5	31.7 \pm 9.0	16 – 44	33.2 \pm 7.1	24 – 42	4.5	1.61
	7	23.7 \pm 6.0	14 – 32	43.2 \pm 10.6	28 – 60	45.0*	3.05
	14	9.2 \pm 2.1	6 – 12	10.7 \pm 2.1	8 – 14	13.9	1.00
2	3	15.5 \pm 3.3	10 – 20	26.2 \pm 5.9	18 – 36	40.9*	3.22
	5	14.2 \pm 6.1	8 – 26	29.7 \pm 9.2	16 – 48	52.1*	2.22
	7	13.0 \pm 5.3	8 – 20	20.2 \pm 2.9	18 – 24	35.8*	3.36
	14	9.5 \pm 4.9	2 – 16	19.2 \pm 6.7	12 – 32	50.6*	1.83
3	3	10.5 \pm 3.1	6 – 16	15.0 \pm 5.7	8 – 22	30.0	3.31
	5	10.5 \pm 5.0	4 – 18	16.2 \pm 7.9	8 – 28	35.3	2.43
	7	4.2 \pm 1.9	2 – 8	8.2 \pm 1.6	6 – 12	48.4*	1.41
	14	7.7 \pm 3.9	4 – 14	13.2 \pm 7.2	8 – 30	41.5*	3.41
4	3	10.0 \pm 3.2	6 – 16	15.7 \pm 5.4	10 – 26	36.5*	2.93
	5	9.5 \pm 3.8	6 – 18	26.0 \pm 12.3	14 – 54	63.4*	10.50
	7	5.2 \pm 3.0	0 – 10	18.7 \pm 8.4	10 – 38	72.0*	7.92
	14	7.7 \pm 1.6	6 – 10	17.0 \pm 5.1	12 – 28	54.4*	9.43

*Diferencia estadística $P < 0.05$ entre el grupo tratado y control en cada muestreo, DE: Desviación estándar, NA: No aplica

Por otra parte, Ojeda-Chi *et al.* (2010) evaluaron el efecto de la mezcla de *M. anisopliae* (Ma14+Ma34) en condiciones de laboratorio sobre larvas de *R. microplus* encontrando un 90 % de eficacia. En el presente estudio aunque la mezcla de las cepas Ma14+Ma34 no alcanzó el 90 % de eficacia encontrada en condiciones *in vitro*, la mezcla de los hongos logró alcanzar una razonable eficacia de 35.8 % a 72.0 % para el control de fases juveniles en bovinos infestados naturalmente. El presente estudio es el primero en reportar el efecto del hongo para el control de fases juveniles de *R. microplus* en bovinos infestados naturalmente.

En condiciones de campo la patogenicidad de *M. anisopliae* está influenciada por factores macroclimáticos (temperatura, humedad y radiación solar) y microclimáticos (composición química de las secreciones de la piel del animal, microflora y temperatura de la piel), los cuales influyen en el nivel de infección de *M. anisopliae* (germinación y penetración) (Fernandes y Bittencourt, 2008; Leemon y Jonsson, 2008; Dantigny y Nanguy, 2009). Leemon *et al.* (2008) evaluaron la eficacia de *M. anisopliae* en

condiciones de laboratorio y de campo sobre bovinos, estos autores reportaron baja mortalidad de garrapatas sobre los animales en comparación con la mortalidad obtenida en condiciones de laboratorio. Los autores concluyeron que los factores microclimáticos de los animales afectan negativamente a las esporas que se inoculan sobre las garrapatas durante el proceso de aspersión de los animales. Los resultados obtenidos por estos autores coinciden con lo encontrado en el presente estudio donde la eficacia de la mezcla de los hongos no alcanzó el 90-100 % como fue obtenido previamente en condiciones de laboratorio (Ojeda-Chi *et al.*, 2010). En otro estudio, Polar *et al.* (2005a) evaluaron el efecto de la radiación solar sobre la temperatura corporal de los animales, así como el efecto de la temperatura corporal sobre la sobrevivencia de las esporas de *M. anisopliae*. Los autores reportaron que las áreas del cuerpo expuestas a la radiación solar presentaban mayores temperaturas (35-40 °C) y por consiguiente menor eficacia del hongo en comparación con las áreas del cuerpo sin el efecto de la radiación solar (30-35 °C). *M. anisopliae* se adhiere, penetra y germina en las garrapatas en las primeras 24 h PT (Arruda *et al.*, 2005); en el presente

estudio el tratamiento aplicado en horas con baja radiación solar (18:00 horas), pudo haber favorecido a la buena eficacia del hongo para el control *in vivo* de *R. microplus*. Además de su eficacia, *M. anisopliae* actúa sobre hospederos específicos (grupos entomológicos) y es seguro para el ser humano y medio ambiente (Goettel y Johnson, 1992; Rath *et al.*, 1995a, b; Kaaya y Hassan, 2000).

Los resultados de este estudio demostraron que el tratamiento con las cepas Ma14+Ma34 de *M. anisopliae* presenta buena eficacia para el control de garrapatas adultas y fases juveniles de *R. microplus* en infestaciones naturales. Este hongo representa una buena alternativa para el control de *R. microplus*; sin embargo, es necesario realizar más estudios enfocados a mejorar la eficacia del hongo en condiciones de campo e incluirlo dentro del programa de control integral de garrapatas, para reducir la dependencia de los acaricidas.

Agradecimientos

Se agradece a CONACYT por la beca otorgada el MVZ. Uriel Rodríguez Alcocer para la realización de sus estudios de Maestría en la CCBA de la UADY. Este proyecto fue financiado por la Fundación Produce Yucatán (0552-07).

REFERENCIAS

- Alonso-Díaz, M.A., García, L., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., Angel-Sahagún, C.A., Rodríguez-Vivas, R.I., 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. *Veterinary Parasitology* 147: 336-340.
- Arieta-Román, R.J., Rodríguez-Vivas, R.I., Rosado-Aguilar, J.A., Ramírez-Cruz, G.T., Basto-Estrella, G. 2010. Persistencia de la eficacia de dos lactonas macrocíclicas contra infestaciones naturales de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos del trópico mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 48(1): 59-67.
- Arruda, W., Lübeck, I., Achrank, I.A., Henning, M. 2005. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology* 37: 231-244.
- Barson, G., Renn, N., Bywater, F. A. 1994. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animal units. *Journal of Invertebrate Pathology* 64: 107-113.
- Castro, A.B.A., Bittencourt, V.R.E.P., Deamon, E., Viegas, E.D.C. 1997. Eficacia do fungo *Metarhizium anisopliae* aobreo carrapato *Boophilus microplus* em teste de estabulado. *Revista Universitaria Rural: Servicio, Ciencia y Vida* 19: 73-82.
- Cen, A.J., Rodríguez, V.R.I., Domínguez, A.J.L., Wagner, G. 1998. Studies on the effect on infection by *Babesia* spp. on oviposition of *Boophilus microplus* engorged females naturally infested in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology* 78: 253-257.
- Dantyni, P., Nanguy, S. 2009. Significance of the physiological state of fungal spores. *International Journal of Food Microbiology* 134:16-20.
- Fernandes, E.K.K., Bittencourt, V.R.E.P. 2008. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Experimental of Applied Acarology* 46: 71-93.
- 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. *Experimental Parasitology* 130: 300-305.
- Lacey, L.A., Martins, A., Riberiro, C. 1994. The pathogenicity of *Metarhizium Anisopliae* and *Beauveria Bassiana* for adults of the Japanese beetle, *Popilia japonica* Coleoptera: Scarabaeidae). *European Journal of Entomology*. 91:313-319.
- Fernández-Ruvalcaba, M., Zhiouab, E., García-Vázquez, Z. 2005. Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Boophilus microplus* sensible y resistente a los organofosforados. *Técnica Pecuaria en México* 43(3): 433-440.
- Goettel, M.S., Johnson, D.L. 1992. Environmental impact and safety of fungal biocontrol agents, In: Lomer C. J., Prior, C. (eds), *Biological Control of Locusts and Grasshoppers*, CAB International, Wallingford, UK. pp. 356–361.
- Kaaya, G. P., Hassan, S. 2000. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Experimental of Applied Acarology* 24:913-926.
- Kaaya, G.P., Samish, M., Hedimbi, M., Gindin, G., Glazer, I. 2011. Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. *Experimental and Applied Acarology* 55(3): 273-281.
- Leemon, D., Turner, D., Jonsson, N. 2008. Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Veterinary Parasitology* 156: 248-260.
- Leemon, D., Jonsson, N. 2008. Laboratory studies on Australian of *Metarhizium anisopliae* as biopesticide for the cattle tick *Boophilus*

- microplus*. Journal of Invertebrate Pathology 97: 40-49.
- Lezama, G.R., Munguía, R.A. 1990. Evaluación de cinco sustratos en la multiplicación masiva de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sor y su virulencia sobre *Spodoptera frugiperda*. In: Smith J.E. (ed.). Proceedings of the XIII Reunión Nacional de Control Biológico, Colima, México, octubre 1990.
- Moorhouse, E.R., Gillespie, A.T., Charnley, A.K. 1993. Selection of virulent and persistent *Metarhizium anisopliae* isolates to control black vine weevil (*Otiorhynchus sulcatus*) larvae on glasshouse begonia. Journal of Invertebrate Pathology 62: 47-52.
- Morin, D., Valdez, R., Lichtensteiger, C., Paul, A., Dipietro, J., Guerino, F. 1996. Efficacy of moxidectin 0.5 % pour-on against naturally acquired nematode infections in cattle. Veterinary Parasitology 65: 75-81.
- Ojeda-Chi, M.M., Rodríguez-Vivas, R.I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R. 2010. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexican tropics. Veterinary Parasitology 170: 348-354.
- Ojeda-Chi, M.M., Rodríguez-Vivas, R.I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., Cruz-Vázquez, R. 2011. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias 2(2): 177-192.
- Polar, P., Aquino De Muro, M., Kairo, M., Moore, D., Pegram, R., John, S.A., Roach-Benn, C. 2005a. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. Veterinary Parasitology 134 (1-2): 159-167.
- Polar, P., Kairo, M., Peterkin, D., Moore, D., Pegram, R., John, S. 2005b. Assessment of fungal isolates for development of a myco-acaricide for cattle tick control. Vector-Borne and Zoonotic Disease 5(3): 276-284.
- Polar, P., Moore, D., Kairo, M., Ramsubhag, A. 2008. Topically applied myco-acaricides for the control of cattle ticks, overcoming the challenges. Experimental and Applied Acarology 46(1-4): 119-148.
- Rath, A.C., Koen, T.B., Anderson, G.C. 1995b. Field evaluation of the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae* (DAT F-001) as a biocontrol agent for the redheaded pasture Cockchafer, *Adoryphorus couloni* (Coleoptera: carabaeidae). Australian Journal of Agricultural Research 46: 429-440.
- Rath, A.C., Worledge, D., Koen, T.B. and Rowe, B.A. 1995a. Long-term field efficacy of the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae* against the subterranean scarab, *Adoryphorus couloni*. Biocontrol Science and Technology 5: 439-451.
- Rodríguez-Vivas, R.I., Quiñones, A.F., Fragoso, S.H. 2005. Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. En: Rodríguez-Vivas, R. I. (ed.). Enfermedades de importancia económica en producción animal. México D.F. McGraw-Hill-UADY. pp. 571-592.
- Rodríguez V.R.I., Rosado, A.A., Basto, E.G., García, V.Z.S., Rosario, C.R., Fragoso, S. 2006. Manual técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino. Publicación Técnica No. 4, CENID- PAVET. Jiutepec, Morelos, México. pp. 1-11.
- Rodríguez-Vivas, R.I., Rivas, A.L., Chowell, G., Fragoso, S.H., Rosario, C.R., García, Z., Smith, S.D., Williams, J.J., Schwager, S.J. 2007. Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico. Veterinary Parasitology 146: 158-169.
- Rodríguez-Vivas, R.I., Trees, A.J., Rosado-Aguilar, J.A., Villegas-Perez, S.L., Hodgkinson J.E. 2011. Evolution of acaricide resistance: Phenotypic and genotypic changes in field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in response to pyrethroid selection pressure. International Journal for Parasitology 41: 895-903.
- SAS Ver 9.2. 2008. Versión para windows by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Sneh, B. 1991. Isolation of *Metarhizium anisopliae* from insects on an improved selective medium based on wheat germ. Journal of Invertebrate Pathology 58: 269-273.
- Warton, R.H., Utech, W. 1970. The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Ixodidae) to the assessment of tick numbers on cattle. Journal of the Australian Entomological Society 9: 171-182.