

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Efectividad de aislados de *Beauveria bassiana* "sensu lato" sobre *Rhipicephalus microplus*

Efectivity of *Beauveria bassiana* isolates "sensu lato" on *Rhipicephalus microplus*

Elio Minel Del Pozo Núñez, Irma García Cruz, Yanira Herrera López

Universidad Agraria de La Habana (UNAH) "Fructuoso Rodríguez Pérez", Carretera a Tapaste y Autopista Nacional km 23 ½, San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32700

Email: epozo@unah.edu.cu

RESUMEN

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de la Habana, Cuba, con el objetivo de determinar la efectividad *in vitro* de aislados de *Beauveria bassiana sensu lato* (Vals.) Vuill sobre huevos y neolarvas de *Rhipicephalus microplus* Canestrini. Los tres aislados evaluados resultaron efectivos, con más de un 85 % de mortalidad sobre las neolarvas del ectoparásito, a los 12 días de aplicados, y en el caso del aislado B_B se evidenció un marcado efecto de la concentración de conidios en la suspensión sobre la eclosión de huevos que resultó nula en la mayor de las concentraciones utilizadas, y sobre la mortalidad de las neolarvas de la garrapata que fue superior al 90 % a partir de las concentraciones de 10⁷ conidios mL⁻¹.

Palabras clave: ectoparásito, garrapata, hongos entomopatógenos, huevos, neolarvas

ABSTRACT

The present project was developed in the Plant Protection Laboratory of the Agronomy Faculty of the Agrarian University of La Habana, Cuba, to determinate the *in vitro* effectivity of some isolates of *Beauveria bassiana sensu lato* (Vals.) Vuill. on eggs and neolarvae of *Rhipicephalus microplus* Canestrini. The three isolates evaluated were effective, with more than 85 % mortality over neolarvae of the ectoparasite, 12 days after application. In the case of the B_B isolate a strong effect of the conidia concentration in the suspension over the eclosion of eggs was evident, wich was null in the highest of the concentrations used, and the mortality of tick neolarvae, that was superior to 90 % with concentrations over 10⁷ conidia mL⁻¹.

Keywords: ectoparasite, ticks, entomopathogen fungi, eggs, neolarvae

INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus microplus* que se encuentra con frecuencia en bovinos, Canestrini es un ectoparásito hematófago principalmente en las regiones tropicales y

subtropicales. Es muy importante por las pérdidas que ocasiona y su gran capacidad de adaptación (Pulido y Cruz, 2013; Valdez *et al.*, 2014; Yessinou *et al.*, 2016). Dentro de los efectos adversos producidos por este ectoparásito, se destaca la transmisión de microorganismos los que causan daño. Así mismo, induce anemia, daño de la piel y estrés; esto último conduce a anorexia, disminución de peso y pérdidas económicas en los sistemas de producción animal (Pulido y Cruz, 2013; Nápoles *et al.*, 2013).

A pesar de que en el ámbito mundial se han utilizado diferentes estrategias para controlar estos ectoparásitos, a través del manejo integrado con control inmunológico por medio de vacunas, hongos, etc., el método más empleado incluye el tratamiento con compuestos químicos como piretroides, organofosforados, carbamatos. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ha favorecido su residualidad en diferentes componentes del ecosistema y la selección de poblaciones de garrapatas resistentes, hasta hacer ineficaz su uso (Domínguez *et al.*, 2016).

En Cuba, se ha generalizado el método de control integrado contra dicho ectoparásito; no obstante, existen informes de la resistencia desarrollada frente a los acaricidas de síntesis, por lo que se hace necesario replantear las estrategias utilizadas actualmente para su control. Dichas estrategias incluyen la aplicación de vacunas antigarrapatas y hongos entomopatógenos (Nápoles *et al.*, 2013; Moncada *et al.*, 2015).

Los hongos entomopatógenos han sido investigados por su potencial en el control biológico de garrapatas debido a su capacidad de penetrar en el tegumento de estos ectoparásitos (Domínguez *et al.*, 2016). En particular, *Beauveria bassiana* sensu lato (Vals.) Vuill. es eficaz en el control de varias especies de garrapatas, incluyendo a *R. microplus*, por lo que es un posible agente de control biológico de esta especie (Murigu *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta lo anterior se propuso la realización del presente trabajo con el objetivo de determinar la eficacia *in vitro* de aislados de *B. bassiana* sobre huevos y neolarvas de *R. microplus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez", San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

Los aislados fúngicos utilizados y su origen, fueron los siguientes:

- B_N: *B. bassiana*, aislado a partir de adultos de *Atta insularis* (Güerin), recolectados en zonas cañeras del municipio de San Nicolás de Bari.
- B_B: *B. bassiana*, aislado a partir de adultos de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) recolectados en campos de café del municipio San José de las Lajas.
- B_C: *B. bassiana*, cepa LBB-1, utilizada en los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE).
- Ll: *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare y Gams, cepa Y-57, utilizada en los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE).

Para la obtención de los huevos y neolarvas de *R. microplus*, se recolectaron hembras ingurgitadas sobre hembras de *Box taurus* de la raza Holstein en la finca "El Jobo" municipio Caimito, provincia Artemisa, las cuales fueron llevadas, el mismo día, al laboratorio y sometidas a un proceso de selección sobre la base de su movilidad, tamaño y color, para buscar la homogeneidad. Posteriormente fueron colocadas individualmente en placas Petri, esto se hizo para facilitar la obtención y manipulación de los huevos y neolarvas.

Eficacia de diferentes aislados de *B. bassiana* y *L. lecanii* sobre neolarvas de *R. microplus*

En este ensayo se utilizaron neolarvas de *R. microplus* obtenidas en el laboratorio como se describió anteriormente, de 7-10 días de edad, no alimentadas.

Además, fueron probados los cuatro aislados fúngicos ya relacionados, para lo cual se dispuso de colonias en placas Petri, de 14 días de edad, bien esporuladas, a partir de las cuales se prepararon suspensiones en agua destilada estéril más Tween 80 al 0,05 %, en frascos Erlenmeyers. Después de homogenizadas las suspensiones en un agitador Vortex, se procedió al conteo mediante la cámara de Neubauer, quedando establecidos los siguientes tratamientos:

- B_N: 2,0 x 10⁸ conidios mL⁻¹
- B_B: 2,3 x 10⁸ conidios mL⁻¹
- B_C: 2,3 x 10⁸ conidios mL⁻¹
- Ll: 1,9 x 10⁸ conidios mL⁻¹
- Control: Agua destilada y estéril más Tween 80 al 0,05 %

Las neolarvas fueron tratadas por inmersión durante 1 min en las suspensiones conidiales de los distintos aislados, y posteriormente se colocaron de 20 a 25 de ellas en frascos de vidrio de 30 mL tapados con cinta de laboratorio (Parafilm "M"[®]) perforada con una fina aguja para permitir el intercambio gaseoso.

Los tratamientos se distribuyeron según un diseño completamente aleatorizado con cinco tratamientos y cuatro repeticiones, y las evaluaciones se realizaron a los 6 y 12 días, contando el número de neolarvas muertas, expresando el resultado como porcentaje de mortalidad. Se consideraron muertas aquellas neolarvas que no se movían al ser estimuladas con un pincel.

Los resultados obtenidos fueron transformados según la expresión $\text{aseno } (p)^{1/2}$ 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).

Efecto de diferentes concentraciones de conidios del aislado B_B de *B. bassiana* sobre huevos de *R. microplus*

En este ensayo se utilizaron huevos obtenidos en el laboratorio, como ya se describió, de 5-7 días de edad, y el aislado B_B de *B. bassiana*. En general, se siguió el procedimiento descrito en el ensayo anterior, pero los tratamientos aquí fueron suspensiones de conidios del hongo con distintos niveles de concentración: $2,1 \times 10^9$, $2,1 \times 10^8$, $2,1 \times 10^7$, $2,1 \times 10^6$, $2,1 \times 10^5$, $2,1 \times 10^4$ conidios mL⁻¹. Se usó un control con agua destilada y estéril más Tween 80 al 0,05 %.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con siete tratamientos (concentraciones) y cuatro repeticiones. Cada repetición con 20-25 huevos. La evaluación se realizó a los 28 días, contando el número de larvas, a partir de lo cual se determinó el porcentaje de huevos eclosionados.

Los datos obtenidos fueron transformados según la expresión $\text{aseno } (p)^{1/2}$ 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).

Efecto de diferentes concentraciones de conidios del aislado B_B de *B. bassiana* sobre neolarvas de *R. microplus*

Los procedimientos para el montaje, incubación y procesamiento de los datos fueron similares a

los descritos en el primer ensayo y la evaluación del porcentaje de mortalidad se realizó a los 7 y 14 días. El criterio de mortalidad de dichas neolarvas fue que no respondían al ser estimuladas con un pincel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Eficacia de diferentes aislados de *B. bassiana* y *L. lecanii* sobre neolarvas de *R. microplus*

En este ensayo los tres aislados de *B. bassiana* y la cepa Y-57 de *L. lecanii* fueron capaces de infectar neolarvas de *R. microplus* y provocar la muerte de las mismas.

Los análisis estadísticos mostraron que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos en los dos momentos evaluados. En la tabla 1, se puede observar que a los 6 días la mayor mortalidad se logró con el aislado B_B de *B. bassiana* y la cepa de *L. lecanii*, sin diferencias estadísticas entre ellas, pero sí con el resto de los tratamientos que no se diferenciaron entre ellos ni del control. Según Domínguez *et al.* (2016) al aplicar *B. bassiana*, a los 10 días la mortalidad estuvo entre un 20 y un 50 %.

A los 12 días, los tres aislados de *B. bassiana* lograron altos porcentajes de mortalidad, superiores al 85 %, sin diferencias estadísticas entre ellos, pero sí con la cepa de *L. lecanii* que también logró una alta mortalidad. Es de destacar que desde hace algunos años ya se habían informado resultados de la efectividad de *L. lecanii* en el control de esta especie de garrapata, incluso superior a la de *B. bassiana* (Rijo, 2009). Más recientemente, también se ha informado sobre el buen efecto de un grupo de cepas de *la especie* sobre el ectoparásito (Alemán *et al.*, 2015).

Efecto de diferentes concentraciones de conidios del aislado B_B de *B. bassiana* sobre huevos de *R. microplus*

En este ensayo se apreció hubo un mayor desarrollo del hongo sobre los huevos en las concentraciones más altas, mientras que en las inferiores lo que predominó fue que de los huevos emergieran las neolarvas del ectoparásito. El análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos, o sea, se evidenció que existe un marcado efecto de la concentración de los conidios en la eclosión de los huevos.

En la Tabla 2 se muestran los resultados del ensayo. Como puede apreciarse, todos los tratamientos con el hongo tuvieron valores

Tabla 1. Efecto de diferentes aislados fúngicos sobre larvas de *R. microplus* en condiciones de laboratorio

Aislados fúngicos	Mortalidad (%)			
	6 días		12 días	
	X orig.	X transf.	X orig.	X transf.
Control	4,09	0,2434 b	4,09	0,2434 c
B _B	13,43	0,2807 a	96,41	0,5152 a
B _C	3,59	0,2413 b	87,29	0,4933 a
B _n	5,75	0,2494 b	92,59	0,5062 a
LI	17,26	0,2949 a	75,36	0,4645 b
C.V. (%)		6,40		3,61
ESx		0,008***		0,008***

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

estadísticamente diferentes al control. Esos valores de porcentaje de huevos eclosionados se incrementaron en la misma medida que disminuyó la concentración de conidios en la suspensión, con diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, excepto el de $2,1 \times 10^7$ y $2,1 \times 10^8$ que no lo hicieron.

Castiñeiras *et al.* (1987) demostraron, en condiciones de laboratorio, la eficacia de dos aislamientos de *B. bassiana* que eliminaron hasta el 92 % de los huevos de la garrapata en unos 15 días. Estos resultados también coinciden con los informados por Narladkar *et al.* (2015) quienes obtuvieron hasta un 90 % de mortalidad.

Efecto de diferentes concentraciones de conidios del aislado B_B de *B. bassiana* sobre neolarvas de *R. microplus*

Los análisis estadísticos mostraron que existen diferencias altamente significativas en los dos momentos evaluados. En la Tabla 3, se muestra que a los 7 días hubo mayor mortalidad en el

tratamiento con la concentración más alta ($2,1 \times 10^9$ conidios mL⁻¹), más de un 60 %, diferente estadísticamente de los restantes tratamientos, y a partir de 10^6 hasta 10^4 conidios mL⁻¹ se obtuvieron los menores valores de mortalidad, sin diferencia entre ellos. Para el segundo momento de evaluación, a los 14 días, los mayores valores de mortalidad (> 90 %) se registraron a partir de 10^9 hasta 10^7 conidios mL⁻¹ sin diferencia entre ellos, pero sí con los otros tratamientos. Los valores más bajos fueron en los tratamientos con las concentraciones de 10^5 y 10^4 conidios mL⁻¹ que fueron iguales entre sí.

Los resultados de estos ensayos confirman los informes de varios autores sobre la efectividad de aislados de *B. bassiana* sobre *R. microplus*. En este sentido, Barci *et al.* (2009) destacaron la importancia de los aislados al evaluar la efectividad del hongo.

Narladkar *et al.* (2015) trabajaron con diferentes aislados de *B. bassiana* y encontraron un buen efecto sobre la eclosión de huevos, larvas

Tabla 2. Efecto de la concentración de conidios del aislado B_B de *B. bassiana* sobre huevos de *R. microplus*, en condiciones de laboratorio

Concentración (conidios mL ⁻¹)	Huevos eclosionados (%)	
	X orig.	X. transf.
Control	97,91	0,5187 a
$2,1 \times 10^9$	0,00	0,2255 f
$2,1 \times 10^8$	8,24	0,2606 e
$2,1 \times 10^7$	14,26	0,2835 e
$2,1 \times 10^6$	32,22	0,3449 d
$2,1 \times 10^5$	61,00	0,4246 c
$2,1 \times 10^4$	79,64	0,4751 b
C.V. (%)		4,53
ESx		0,008***

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

Tabla 3. Efecto de la concentración de conidios del aislado B_B de *B. bassiana* sobre larvas 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	3,76	0,2420 e	3,90	0,2426 d
2,1 x 10 ⁹	62,67	0,4318 a	100,00	0,5236 a
2,1 x 10 ⁸	38,51	0,3642 b	97,87	0,5186 a
2,1 x 10 ⁷	19,64	0,3031 c	90,46	0,5012 a
2,1 x 10 ⁶	14,89	0,2861 cd	68,98	0,4472 b
2,1 x 10 ⁵	12,13	0,2758 d	36,66	0,3580 c
2,1 x 10 ⁴	10,19	0,2680 d	30,32	0,3389 c
C.V. (%)		5,28		5,45
ESx		0,008***		0,011***

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

y parámetros poblacionales de la garrapata. También Cafarchia *et al.* (2015) demostraron que esta especie puede resultar efectiva sobre las diferentes fases de desarrollo de las garrapatas del género *Rhipicephalus*.

Por otro lado, se ha demostrado que la mortalidad de las garrapatas se incrementa en la misma medida que lo hace la concentración de conidios (Kaaya y Hedimbi, 2012; García *et al.* 2016).

Los resultados obtenidos en estos ensayos demuestran que en las condiciones de Cuba, se dispone de aislados de *B. bassiana* con potencial para ser desarrollados como agentes de control biológico de la garrapata del ganado *R. microplus*, aunque aún es necesario seguir profundizando en su eficacia hasta el nivel de campo, así como en su reproducción masiva, formulación y técnicas de aplicación.

CONCLUSIONES

Los tres aislados probados de *B. bassiana* mostraron una elevada efectividad sobre las neolarvas de *R. microplus*, mientras que se demostró que el efecto del aislado B_B sobre los huevos y neolarvas del ectoparásito aumentó en la medida que la concentración de conidios fue mayor.

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.

BARCI, L.A., ALMEIDA, J.E., NOGUEIRA, A.H., ZAPPELINI, L.O., PRADO, A.P. 2009. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodiade). *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 18: 7-13.

CAFARCHIA, C., INMEDIATO, D., IATTA, R., NASCIMENTO, R.A., PORRETTA, D., AGUIAR, L., DANTAS, F., OTRANTO, D., LIA, R.P. 2015 Native strains of *Beauveria bassiana* for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. *Parasites and Vectors*, 8: 80-87.

CASTIÑEIRAS, A., JIMENO, G., LÓPEZ, M., SOSA, L. 1987. Efecto de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Fungi imperfecti) y *Pheidole megacephala* (Hymenoptera: Formicidae), contra huevos de *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Revista Salud Animal*, 9: 288-293.

DOMÍNGUEZ, O.M., OLIVA, M.A., AGUILAR, G., MENDOZA, P., RUIZ, B., BAUTISTA, G.U., CULEBRO, J.M., GUTIÉRREZ, F.A. 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.

GARCÍA, D.J., RODRÍGUEZ, R.I., PULIDO, M.O., DÍAZ, A.M. ANDRADE, R.J. 2016. Evaluación *in vitro* de *Cordyceps bassiana* (Ascomycota: Sordariomycetes) en el Control

- Biológico de *Rhipicephalus microplus*. *Revista Investigaciones Veterinaria Perú*, 27 (1): 130-136.
- KAAYA, G.P., HEDIMBI, M. 2012. The use of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, as bio-pesticides for tick control. *International Journal of Agricultural Sciences*, 2 (6): 245-250.
- MONCADA, A.C., DAVID VILLAR, D., CHAPARRO, J.J., ANGULO, J., MAHECHA, M.L. 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.
- MURIGU, M.M., NANA, P., WARUIRU, R.M., NGANGA, C.J., EKESI, S., MANIANIA, N.K. 2016. Laboratory and field evaluation of entomopathogenic fungi for the control of amitraz-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus decoloratus*. *Veterinary Parasitology*, 225: 12–18.
- 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.
- PULIDO, N.J Y CRUZ, A. 2013. Eficacia de los extractos hidroalcohólicos de dos plantas sobre garrapatas adultas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Corpoica Ciencia Tecnológica Agropecuaria*, 14 (1): 91-97.
- RIJO, E. 2009. Control de garrapata del ganado, *Boophilus microplus* (Canestrini) con hongos entomopatógenos. Disponible en: <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/GARRAPAT.htm>. Consultado: 10 de enero de 2016.
- 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. 2014. Eficacia de *Metarhizium anisopliae* en garrapatas *Rhipicephalus microplus* en Indaparapeo y Tzitzio, Michoacán. *Entomología Mexicana*, 1: 321-325.
- YESSINO, R.E., AKPO, Y., ADOLIGBE, C., ADINCI, J., ASSOGBA, M.N., KOUTINHOIN, B., KARIM, I.Y., FAROUGOU, S. 2016. Resistance of tick *Rhipicephalus microplus* to acaricides and control strategies. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4 (6): 408-414.

Recibido el 20 de febrero de 2017 y aceptado el 15 de junio de 2018