

Patogenicidad de *Lecanicillium lecanii* (Fungi) sobre la garrapata *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) en laboratorio

Pathogenicity of *Lecanicillium lecanii* (Fungi) on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in the laboratory conditions

CATALINA BELTRÁN ALZATE¹, ANA ISABEL GUTIÉRREZ G.², YAMILLE SILDARRIAGA O.³

Resumen: Se determinó en laboratorio la patogenicidad del hongo *Lecanicillium lecanii* sobre la garrapata del ganado *Boophilus microplus*. Se sumergieron las garrapatas en soluciones con concentraciones de *L. lecanii* (CIAT 215), $1,25 \times 10^1$, $1,25 \times 10^5$ y $1,25 \times 10^8$ conidios/mL colocándolas individualmente en cajas de Petri. Los testigos fueron sumergidos en agua destilada. El análisis estadístico mostró que los periodos de preoviposición en las hembras tratadas con *L. lecanii* y los testigos presentaron diferencias significativas. En el periodo de oviposición hubo diferencias significativas entre los testigos y las concentraciones $1,25 \times 10^1$, $1,25 \times 10^5$ y $1,25 \times 10^8$ conidios/mL. La supervivencia de las garrapatas mostró diferencias entre los testigos y las concentraciones de *L. lecanii*. De las 120 garrapatas inoculadas 115 (95,8%) fueron conidiadas, y se observó una invasión total al noveno día. El porcentaje de eclosión se redujo notablemente en todos los tratamientos comparados con el testigo. Se observó una supervivencia reducida de las larvas tratadas a la concentración de $1,25 \times 10^8$ conidios/mL (73%) comparada con el testigo (100%). La concentración $1,25 \times 10^8$ conidios/mL del hongo *L. lecanii* presentó un efecto significativo sobre la oviposición, la supervivencia de las hembras teleoginas inoculadas, el porcentaje de eclosión de las masas de huevos y la supervivencia de larvas provenientes de huevos de *B. microplus* inoculados.

Palabras clave: Supervivencia. Hongo entomopatógeno. Oviposición. Preoviposición.

Abstract: The pathogenicity of the fungus *Lecanicillium lecanii* on the cattle tick *Boophilus microplus* was determined under laboratory conditions. Ticks were submerged in solutions of three concentrations of *L. lecanii* (CIAT 215), $1,25 \times 10^1$, $1,25 \times 10^5$, and $1,25 \times 10^8$ conidia/mL, and these were placed individually in Petri dishes. Control ticks were submerged in distilled water. Statistical analyses showed significant differences in the period of preoviposition of females treated with *L. lecanii* between treatments and the control. In the period of oviposition there were significant differences between the controls and the concentrations $1,25 \times 10^1$, $1,25 \times 10^5$, and $1,25 \times 10^8$ conidia/mL. The survival of ticks showed differences between the control and the concentrations of *L. lecanii*. Of the 120 ticks inoculated, 115 (95,8%) were conidiated, and a total invasion was observed at ninth day. The percentage of emergence was notably reduced in all treatments compared with the control. A reduced survival of the larvae was observed at the concentration $1,25 \times 10^8$ conidia/mL (73%), compared with the control (100%). The concentration $1,25 \times 10^8$ conidia/mL of the fungus *L. lecanii* presented a significant effect on oviposition, the survival of the engorged females inoculated, the percentage of emergence of egg masses, and the survival of the larvae coming from the inoculated eggs of *B. microplus*.

Key words: Survival. Entomopathogenic fungus. Oviposition. Preoviposition.

Introducción

En áreas tropicales y subtropicales como Colombia, existen serias limitantes para el desarrollo de la industria bovina por la presencia de diversas especies de garrapatas, no sólo por los daños directos que ocasionan, sino también por ser transmisoras de microorganismos, principalmente los causantes de la anaplasmosis y babesiosis bovina. Estas enfermedades están ampliamente difundidas en Colombia desde el nivel del mar hasta los 2.200 msnm, en las cuales los factores climáticos (temperatura, humedad, precipitación y altitud) son favorables para la multiplicación y desarrollo de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Benavides 1983; Benavides *et al.* 1999; Lamberti y Bulman 2002; De la Cruz y Vahos 2004). *B. microplus*, es un ectoparásito hematófago, con cubierta quitinosa, dura y protectora que puede soportar largos periodos de inanición; cuenta con un amplio rango de

hospederos, alta tasa de oviposición, prácticamente carece de enemigos naturales y las condiciones ecológicas donde se encuentra comúnmente favorecen la infestación provocando graves alteraciones en los animales con repercusiones en la economía de la actividad ganadera (Marín 2002; Armendáriz 2003).

Una de las estrategias más utilizadas para el tratamiento de animales infestados con *B. microplus* es la aplicación de acaricidas como organofosforados, amidinas, piretroides e ivermectinas a intervalos específicos; también se han utilizado extractos de plantas y semillas. Sin embargo, la resistencia adquirida por las garrapatas a estos productos ha motivado el uso de métodos alternativos de control parasitario como el uso de hongos entomopatógenos. Estos organismos se han constituido en grandes biocontroladores de insectos y ácaros plagas de cultivos y animales. El control biológico utilizando estas alternativas consiste en el empleo de biopreparados a partir de

¹ Bióloga. Grupo de Micología. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Corporación para el estudio de Patologías Tropicales. Universidad de Antioquia. A.A 1226. Medellín, Colombia. catabeltran01@yahoo.es.

² Bióloga. M. Sc. Investigadora Asociada al Grupo de Micología. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Corporación para el Estudio de Patologías Tropicales. Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín, Colombia. anaaisaguti@gmail.com.

³ Autor para correspondencia: Licenciada en Biología y Química. M. Sc. Profesora de Micología. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Corporación para el Estudio de Patologías Tropicales. Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín, Colombia. Fax: 2105666. ysaldar@matematicas.udea.edu.co.

los hongos que son aplicados por medio de baños al ganado o en el pasto (García 2002; Martínez *et al.* 2002; Fragas *et al.* 2006).

El hongo *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Zare & Gams, 2001 [= *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viégas] tiene amplia distribución mundial y un gran espectro como agente potencial en control biológico de diferentes hospederos como áfidos, escamas, coleópteros, dípteros, colémbolos y garrapatas, por esta razón ha sido estudiado como posible agente de control de estos artrópodos en diferentes investigaciones (Tanada y Kaya 1993; Humber 1997; Obregón 2002). Rijo *et al.* (1998) realizaron un estudio en la Provincia de la Habana (Cuba) determinando la efectividad del biopreparado a base del hongo *V. lecanii* cepa LBVL-2 para infectar a los estados parasíticos de *B. microplus* encontrando una efectividad entre el 47,5 y 78,7%. Vitorte *et al.* (1998, 2003) realizaron estudios en novillos de establo asperjados con biopreparados de *L. lecanii* encontrando resultados similares.

Por otro lado, Díaz y Chuquiyaury (2002) en la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco (Perú), evaluaron el efecto de las dosis de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill, 1912 y *L. lecanii* a concentraciones de 3×10^{11} conidios/g en 92 vacunos de diferentes razas, sexo y con diferentes grados de infestación de garrapatas, obteniendo mortalidad a los 12 días después de la inoculación. La mezcla de ambos entomopatógenos, produjo una mejor respuesta con un 77% de efectividad. En un estudio en Colombia se evaluaron de forma comparativa 10 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. 1883, *B. bassiana* y *L. lecanii* sobre teleoginas ingurgitadas (hembras maduras y listas para desprenderse del hospedador) de *B. microplus* encontrándose el mayor efecto sobre la reproducción con el aislamiento Mt019 de *M. anisopliae* con el cual se obtuvo un 87% de inhibición en la reproducción a la dosis de 10^9 conidios/mL (FAO 2003).

Recientemente, Cardona (2005), evaluó el efecto de *B. bassiana* y *M. anisopliae* y una combinación de ambos hongos sobre *B. microplus* adultas y su oviposición en condiciones de laboratorio. En sus resultados se observó que tanto la supervivencia de los adultos como el porcentaje de eclosión de larvas se redujo por efectos del hongo entomopatógeno, especialmente por la mezcla de ambos.

El potencial biocontrolador del hongo *L. lecanii* contra *B. microplus*, demostrado en los estudios mencionados, justifica la búsqueda de aislados más eficientes, no sólo en el control de las hembras teleoginas sino también en huevos o larvas. El objetivo de este estudio fue evaluar en el laboratorio la patogenicidad del hongo entomopatógeno *L. lecanii* (CIAT 215) en hembras ingurgitadas de *B. microplus* y sus huevos.

Materiales y Métodos

Recolección de las garrapatas. El estudio se realizó en el laboratorio de Micología del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia. Se colectaron manualmente aproximadamente 500 garrapatas teleoginas de *B. microplus* sobre bovinos en la Central Ganadera de la ciudad de Medellín. Las garrapatas se depositaron en frascos de vidrio de boca ancha (7cm de diámetro) que fueron tapados con gasa y llevados al laboratorio donde se verificó su identidad taxonómica utilizando las claves de López (1980) y Parra *et al.* (1999). Las garrapatas se lavaron con agua y se sumergieron durante un minuto en solución de hipoclorito de sodio al 1% para desinfectarlas, luego se secaron y pesaron individualmente en una

balanza (Adam Equipment, AE, ACB 600, $max = 600$ g, $d = 0,02$ g). Se conformaron tres grupos homogéneos en peso (el primero de 0,10 a 0,19 g, el segundo de 0,20 a 0,29 g y el tercero de 0,30 a 0,39 g).

Origen y mantenimiento de la cepa del hongo. El hongo *L. lecanii* aislado de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* Westwood, 1856 (Hemiptera: Aleyrodidae) (CIAT 215) fue suministrado por el laboratorio Biotropica, Medellín, Colombia y cultivado a temperatura ambiente en botellas de arroz acidificado (ácido láctico) y en cajas de Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA), MERCK KgaA Darmstadt, Alemania, al cual se le adicionó un macerado de garrapatas (1,5 g) obtenido después de someterlas por un tiempo de 30 minutos a soluciones de HCl al 0,2 N y NaOH al 0,1 N (Protocolo adaptado de Barranco *et al.* 2002). El hongo se mantuvo en el laboratorio de Micología del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia por un tiempo de cultivo de 20 días antes de la inoculación. Para reactivar *in vivo* la patogenicidad del hongo se realizaron bioensayos con 90 hembras de *B. microplus* ingurgitadas utilizando diferentes concentraciones como tratamientos: $1,25 \times 10^1$, $1,25 \times 10^5$ y $1,25 \times 10^8$ conidios/mL de *L. lecanii*. Las garrapatas muertas diariamente fueron llevadas a cámara de humedad para evaluar la conidiación del hongo como una prueba de su patogenicidad. Del hongo obtenido a partir de los cadáveres se realizaron cultivos monospóricos siguiendo la técnica descrita por Calle (2000). La determinación taxonómica y verificación del hongo, previo a cada ensayo, se realizó siguiendo las claves de Barnett (1967), Samson *et al.* (1984), Domsch y Gams (1993), Kirk *et al.* (2001) y Barnett y Hunter (2003).

Pruebas de Patogenicidad

Preparación de la suspensión de conidios. A partir de los cultivos en PDA y Arroz acidificado se preparó una suspensión inicial de conidios de *L. lecanii* en 200 mL de agua destilada con Tween 80 (0,05%), y se estimó su concentración mediante conteo de conidios utilizando cámara de Neubauer (Goettel e Inglis 1997; Pérez 1997). A continuación se prepararon las concentraciones de $1,25 \times 10^1$, $1,25 \times 10^5$ y $1,25 \times 10^8$ conidios/mL.

Bioensayos

1. Inoculación de hembras teleoginas de *Boophilus microplus*.

Se conformaron 16 grupos cada uno constituido por 30 hembras de *B. microplus* completamente ingurgitadas, homogéneas en cuanto a peso, tamaño y vitalidad. Se seleccionaron cuatro grupos como testigos, los doce grupos restantes fueron utilizados con las concentraciones a evaluar. Cada uno se sumergió en 100 mL de las suspensiones conidiales de *L. lecanii* ($1,25 \times 10^1$, $1,25 \times 10^5$ y $1,25 \times 10^8$ conidios/mL) durante diez minutos y los testigos se sumergieron en agua destilada estéril. Se eliminó el exceso de humedad y después cada garrapata se depositó de manera individual en una caja de Petri y fue incubada en cámara climatizada (WTB binder 78532, Tuttlingen, Alemania) con temperatura controlada de $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y humedad relativa superior al 85% durante 21 días, periodo en el cual la hembra ingurgitada no necesita alimentarse y lleva a cabo la oviposición.

Después de la inoculación se determinó el período de prepostura, de oviposición y la supervivencia de las garrapatas. Luego de 21 días de realizado el ensayo y una vez finalizado el periodo de oviposición, se recogieron los huevos de cada garrapata, se pesaron en masa, cada masa de huevos se depositó en un tubo de ensayo y se llevaron a cámara climatizada en condiciones similares a las descritas anteriormente durante ocho días para medir el porcentaje de eclosión. Para evaluar el desarrollo del hongo en el cuerpo de las garrapatas muertas éstas se colocaron en cámara de humedad y se observaron diariamente, se estableció el tiempo de aparición del micelio hasta la invasión completa. Posteriormente se realizaron montajes con azul de lactofenol del hongo obtenido de algunas garrapatas muertas colonizadas para verificar la presencia de *L. lecanii* en el cuerpo.

2. Inoculación de huevos obtenidos de hembras teleoginas de *B. microplus*

Se recolectaron hembras de *B. microplus* teleoginas y se incubaron en cámara climatizada (a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y humedad relativa superior a 85%) durante 21 días para obtener huevos. Después de este tiempo, los huevos se pesaron y se formaron 40 grupos de 0,1 g de peso y se sumergieron en 50 mL de las suspensiones de hongo así: diez para la concentración $1,25 \times 10^1$, diez para la concentración $1,25 \times 10^5$, diez para la concentración $1,25 \times 10^8$ conidios/mL, y diez para los testigos (agua destilada estéril). Luego se eliminaron los excesos de la solución y se dejaron sin tapar durante 24 horas para permitir un secado adecuado. Para cada tubo se utilizó un tapón con una envoltura adherible transparente que permitió la ventilación y se dejaron en cámara climatizada durante 21 días realizando observaciones al estereomicroscopio para determinar el tiempo de eclosión y el porcentaje de supervivencia larvaria postinoculación de los huevos.

Parámetros evaluados

Supervivencia de garrapatas adultas. Se registró diariamente el número de garrapatas adultas muertas para cada concentración del hongo *L. lecanii*.

Periodo de preoviposición y oviposición. Se calculó el periodo de preoviposición y oviposición en las hembras teleoginas inoculadas con las diferentes concentraciones del hongo.

Porcentaje de eclosión y supervivencia larvaria. Para los dos ensayos el porcentaje de eclosión se calculó mediante un conteo de cascarones y la supervivencia larvaria se determinó ocho días después de observar la eclosión de todos los huevos.

Índice de eficiencia de la conversión (IEC). (IEC) = Peso de los huevos de la unidad experimental / peso de las hembras de la unidad experimental al inicio del ensayo, es un parámetro cuantitativo utilizado para determinar la conversión del peso de una hembra ingurgitada en huevos (Benavides *et al.* 1999).

Eficiencia del hongo (EH). El índice de eficiencia de la conversión (IEC) de cada grupo de garrapatas tratadas se comparó con el IEC de los grupos control para obtener la eficiencia del hongo. $\text{EH} = (\text{IEC grupo control} - \text{IEC grupo tratado}) / (\text{IEC grupo control}) \times 100$ (Raymond *et al.* 2004).

Análisis estadístico. Las variables peso final, peso de la oviposición, periodo de preoviposición, periodo de oviposición, y porcentaje de eclosión de huevos se estudiaron mediante análisis de varianza bifactorial teniendo en cuenta como factores el peso inicial de la garrapata y la concentración del hongo. La mortalidad diaria para cada concentración se comparó mediante las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier aplicando la prueba Generalizada de Gehan Wilcoxon. Se calculó también el tiempo letal 50 (TL_{50}) para cada concentración. Las comparaciones múltiples de medias se efectuaron con la prueba de Newman-Keuls para $\alpha = 0,05$. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico STATISTICA 7.0 (Statsoft, Inc. Tulsa, Ok, U.S.A).

Resultados y Discusión

Periodos de preoviposición y oviposición. Independientemente de la concentración de *L. lecanii* el peso inicial más bajo de las hembras inoculadas de *B. microplus* (0,10 – 0,19 g) presentó mayor tiempo promedio de preoviposición (Anova Peso inicial: $F_{2,461} = 23,48$, $P < 0,001$. Concentración: $F_{3,461} = 1,75$; $P = 0,16$. Interacción: $F_{6,461} = 1,01$; $P = 0,42$) (Tabla 1). A diferencia de este resultado, Gallardo y Morales (1999) trabajando con *B. microplus* no inoculadas en condiciones de laboratorio ($23 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura y $85 \pm 10\%$ de humedad relativa y fotoperiodo de 12:12 horas Días: Noche) encontraron una correlación baja y positiva entre el peso inicial de las teleoginas y el periodo de preoviposición, ($r = 0,27$). Una correlación negativa como la encontrada en el presente estudio se registró por Davey *et al.* (1980) y la Universidad de la Habana (1974) (citados por Gallardo y Morales 1999), en este último trabajo se resaltó que solo existe esta correlación negativa entre los dos factores a temperaturas entre 30 y 32°C pero que dado que la correlación es débil quizás un número mayor de garrapatas podrían detectar lo que ocurre a temperaturas inferiores.

En el presente estudio se evaluaron 120 garrapatas en grupos de peso homogéneos a temperatura de $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (superior a la reportada por Gallardo y Morales y un poco inferior a la reportada por el trabajo de la Universidad de la Habana) y la relación entre las dos variables fue negativa (menor peso, mayor periodo de preoviposición), sugiriendo de esta manera que dicha correlación depende de la temperatura y que ella podría ser un factor crítico para aumentar o disminuir el periodo de preoviposición de acuerdo al peso de las garrapatas. En cuanto a la concentración ésta no tuvo efecto en dicho periodo, estos resultados concuerdan con lo encontrado por Cardona (2005) trabajando con *B. microplus*, utilizando *M. anisopliae* y *B. bassiana* en condiciones de laboratorio a concentración $1,25 \times 10^8$ conidios/mL. Además, Cardona (2005) encontró que el periodo de preoviposición fue de 5,42 y 5,5 días respectivamente, mucho mayor que el encontrado en este trabajo.

Por otro lado, el período de oviposición de *B. microplus* resultó influenciado significativamente tanto por el peso inicial como por la concentración (Tabla 1). La prueba de Newman-Keuls mostró que a medida que crece la concentración del hongo disminuye el periodo de oviposición (18,5, 16,3, 13,6 y 7,2 días respectivamente) y, por otra parte, las garrapatas con mayor peso inicial presentaron un periodo de oviposición más prolongado (14,8 días); sin embargo, el periodo más corto fue para el peso intermedio (0,20 – 0,29 g) con 13 días (ANOVA Peso inicial: $F_{2,461} = 13,41$; $P < 0,001$).

Tabla 1. Efecto del hongo *L. lecanii* sobre los periodos de preoviposición, oviposición, peso de oviposición y peso final en hembras de *B. microplus* en relación con peso inicial de las garrapatas en condiciones controladas de laboratorio. Media ± desviación estándar.

Dosificación	Peso inicial garrapata (g)	Periodo preoviposición (días)	Periodo oviposición (días)	Peso de oviposición (g)	Peso final garrapatas	IEC ER
Testigo	0,10-0,19	1,63 ± 0,56	17,80 ± 2,22	0,074 ± 0,028	0,024 ± 0,019	0,5103
1,25x10 ¹	0,10-0,19	1,62 ± 0,62	15,48 ± 3,28	0,073 ± 0,023	0,019 ± 0,017	0,5034
1,25x10 ⁵	0,10-0,19	1,93 ± 0,52	14,73 ± 4,35	0,063 ± 0,032	0,023 ± 0,027	0,4344
1,25x10 ⁸	0,10-0,19	1,70 ± 0,47	7,70 ± 0,88	0,066 ± 0,029	0,043 ± 0,023	0,4551
Testigo	0,20-0,29	1,37 ± 0,52	18,47 ± 2,02	0,123 ± 0,036	0,050 ± 0,028	0,5020
1,25x10 ¹	0,20-0,29	1,40 ± 0,59	14,86 ± 3,90	0,120 ± 0,038	0,044 ± 0,029	0,4897
1,25x10 ⁵	0,20-0,29	1,47 ± 0,73	12,41 ± 4,00	0,126 ± 0,035	0,052 ± 0,027	0,5142
1,25x10 ⁸	0,20-0,29	1,25 ± 0,54	6,22 ± 2,92	0,078 ± 0,047	0,095 ± 0,029	0,3183
Testigo	0,30-0,38	1,17 ± 0,46	19,20 ± 1,42	0,138 ± 0,045	0,077 ± 0,029	0,4058
1,25x10 ¹	0,30-0,38	1,33 ± 0,48	18,43 ± 1,91	0,130 ± 0,055	0,062 ± 0,020	0,3823
1,25x10 ⁵	0,30-0,38	1,24 ± 0,44	13,59 ± 4,08	0,166 ± 0,044	0,076 ± 0,038	0,4882
1,25x10 ⁸	0,30-0,38	1,27 ± 0,52	7,80 ± 2,85	0,116 ± 0,057	0,111 ± 0,033	0,3411

Concentración: $F_{3,461} = 266,4$; $P < 0,001$. Interacción: $F_{6,461} = 3,70$; $P = 0,0013$. Cardona (2005) además encontró que a $1,25 \times 10^8$ conidios/mL el período de oviposición fue de 6,7 y 4,53 días respectivamente.

Gallardo y Morales (1999) encontraron que el período de preoviposición y oviposición de *B. microplus* sin tratamiento con hongo en condiciones controladas de laboratorio fueron mayores (4,74, 23,4 días respectivamente) que los obtenidos en nuestro estudio con los testigos. Al respecto, Gallardo y Morales, (1999) encontraron que durante el proceso de oviposición el 58,61% del peso de la garrapata se convirtió en huevos. Meléndez (1998) reporta que en hembras ingurgitadas el 55-60% de su peso corporal corresponde a huevos y el 40-45% restante a sangre y órganos.

Índice de eficiencia de la conversión. Al calcular el índice de eficiencia de la conversión (IEC) se encontró que para los testigos fue de 0,4727 y para las garrapatas inoculadas a la concentración más alta, 0,3715 lo que indica que *L. lecanii* reduce la conversión del peso corporal de la garrapata en huevos (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de eclosión de huevos, índice de eficiencia de la Conversión (IEC), eficiencia reproductiva (ER) y eficiencia del hongo (EH) sobre *B. microplus* inoculadas a diferentes concentraciones con *L. lecanii*.

Dosificación	Eclosión %	Índice de eficiencia de la conversión (IEC)	Eficiencia del hongo (EH) %
Testigo	93,8	0,4727	0
1,25x10 ¹	89,4	0,4584	3,025
1,25x10 ⁵	90,7	0,4789	-1,311
1,25x10 ⁸	74,4	0,3715	21,41

En cuanto a la concentración se encontró que solamente la más alta ($1,25 \times 10^8$ conidios/mL) redujo significativamente el peso de la masa de huevos (0,087 g.) comparado con el peso promedio de las demás que presentaron un peso similar (0,118; 0,106 y 0,112 g en orden decreciente respectivamente), (Tabla 1) (ANOVA Peso inicial: $F_{2,461} = 87,2$; $P < 0,001$. Concentración: $F_{3,461} = 12,1$; $P < 0,001$. Interacción: $F_{6,461} = 4,8$; $P < 0,001$). Aunque la interacción peso inicial versus concentración fue significativa, ésta no fue influyente (Fig. 1).

El porcentaje de eclosión de huevos que provenían de teleoginas, inoculadas con *L. lecanii* no resultó influenciado por el peso inicial de la garrapata pero si lo fue por la concentración del hongo. La concentración más alta obtuvo el porcentaje de eclosión más bajo (74,4%) mientras que las demás presentaron porcentajes similares (90,7, 89,4 y 93,8%) (ANOVA Peso inicial: $F_{2,432} = 0,54$; $P = 0,58$. Concentración: $F_{3,432} = 10,45$; $P < 0,01$. Interacción: $F_{6,432} = 1,52$; $P = 0,17$). Cardona (2005) en estudios similares realizados con *B. microplus*, a la concentración $1,25 \times 10^8$ conidios/mL con *M. anisopliae* y *B. bassiana* en condiciones de laboratorio, encontró que el porcentaje de eclosión de larvas fue de 95% y 93,33% respectivamente.

El análisis de supervivencia de las hembras teleoginas de *B. microplus* inoculadas con diferentes concentraciones de *L. lecanii* mostró diferencias significativas entre las concentraciones del hongo $X_2 = 299,3$; $P < 0,001$ (Fig. 2). Las curvas se compararon entre sí siguiendo el método de Bonferroni con $\alpha = 0,017$. Se encontró que a mayor concentración del hongo fue menor el promedio de días de supervivencia como el TL_{50} (Tabla 3). Cardona (2005) con *B. microplus*, encontró que a esta misma concentración utilizando *M. anisopliae* y *B. bassiana*, el tiempo promedio de supervivencia de garrapatas adultas inoculadas fue de 15,1 y 11,4 días, respectivamente.

Por su parte, Benjamín *et al.* (2002) evaluaron en condiciones de campo y de laboratorio el efecto del hongo *M. anisopliae* sobre garrapatas adultas *Ixodes scapularis* Say, 1821 encontrando que a $4,0 \times 10^9$ conidios/mL hubo una mortalidad del 53% y 96% respectivamente después de cuatro se-

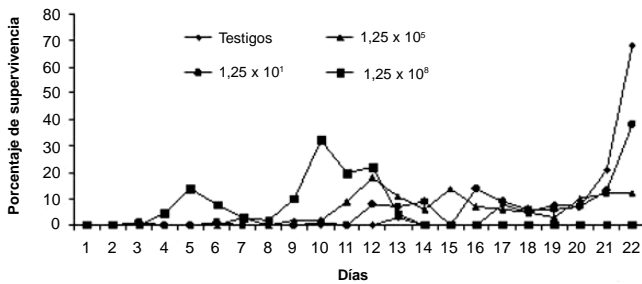


Figura 1. Peso de oviposición según el peso inicial de las garrapatas y la concentración del hongo *L. lecanii*.

manas de inoculado el hongo. En condiciones de campo la mortalidad más alta de garrapatas ocurrió entre las semanas dos y tres. La mortalidad del grupo testigo fue del 3% en las garrapatas infectadas en condiciones de campo y del 2% para las inoculadas en condiciones de laboratorio.

Comparando los resultados de supervivencia obtenidos en el presente estudio con los investigadores anteriores, se observa un mayor efecto potencial de *L. lecanii* sobre *B. microplus* seguido por *B. bassiana* y *M. anisopliae*, concluyéndose que a medida que se aumentan las concentraciones del hongo disminuye la supervivencia de las garrapatas. Igualmente, Khodadad *et al.* (2007) en un estudio en Irán evaluaron la virulencia de 11 aislamientos nativos de hongos entomopatógenos; *M. anisopliae* (tres aislamientos), *B. bassiana* (seis aislamientos) y *Lecanicillium psalliotae* (Treschow) Zare & W. Gams (dos aislamientos) que fueron estudiados contra diferentes estados de desarrollo de *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (Say, 1821) a diferentes concentraciones 10^3 , 10^5 , 10^7 conidios/mL, encontrando que el porcentaje de mortalidad de las hembras ingurgitadas era dependiente de la dosis con respecto a la concentración conidial usada y los porcentajes de mortalidad total observados fueron de 90-100%, 70 y 56,6% para *M. anisopliae* (IRAN 437 C y DEMI 001), *B. bassiana* (IRAN 403 C) y *L. psalliotae* (IRAN 468 C) postinoculación con 10^7 conidios/mL, respectivamente.

En laboratorio, la patogenicidad de *M. anisopliae* sobre los adultos de *I. scapularis* fue evaluada encontrándose que la mortalidad de la garrapata *I. scapularis* fue positivamente relacionada con la concentración de esporas de *M. anisopliae*, como fue demostrado previamente con adultos y larvas de *I. scapularis* por Zhioua *et al.* 1997 (citados por Benjamín *et al.* 2002). Una concentración de 10^6 conidios/mL tendría un efecto bajo en la mortalidad de garrapatas, mientras que una concentración de 10^7 conidios/mL produciría una mortalidad cercana al 50%. Similares resultados han sido registrados para *B. microplus* por otros autores (Benjamín *et al.* 2002). En cuanto a la conidiación, observada en los cadáveres de las garrapatas analizadas en placas con azul de lactofenol para identificación, se encontró que a medida que aumenta la concentración del hongo también aumenta el porcentaje de garrapatas conidiadas (Tabla 4) y presentaron invasión total entre el noveno y catorceavo día postinoculación (Figs. 3A-E).

Cardona (2005) en estudios realizados con *B. microplus*, a $1,25 \times 10^8$ conidios/mL con *M. anisopliae* y *B. bassiana* en condiciones de laboratorio, encontró que a las dos semanas el 75% y el 90% de las garrapatas tratadas estaban completamente cubiertas por los hongos después de ocho días postinoculación. Benjamín *et al.* (2002) evaluaron el efecto de *M.*

anisopliae y *B. bassiana* a $4,0 \times 10^9$ conidios/mL en *I. scapularis* observando que el hongo requiere dos semanas para invadir las y que a mayor concentración de *L. lecanii*, se presenta mayor invasión de éste sobre la garrapata.

De los testigos el 45% resultaron infectados por hongos ambientales: *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp., bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona* sp. y *Serratia* sp., lo que concuerda con Jonsson (2004) quien plantea que muchas especies de bacterias como *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, y *Escherichia coli* han sido aisladas de garrapatas.

En este estudio las garrapatas inoculadas con diferentes concentraciones del hongo *L. lecanii* presentaron infección por bacterias, pero no infección por bacterias y hongos al mismo tiempo (Tabla 4). El aclaramiento de estas garrapatas inoculadas con KOH al 5, 10, 15 y 20% y las preparaciones con azul de lactofenol mostraron que la conidiación fue la causa principal de su muerte.

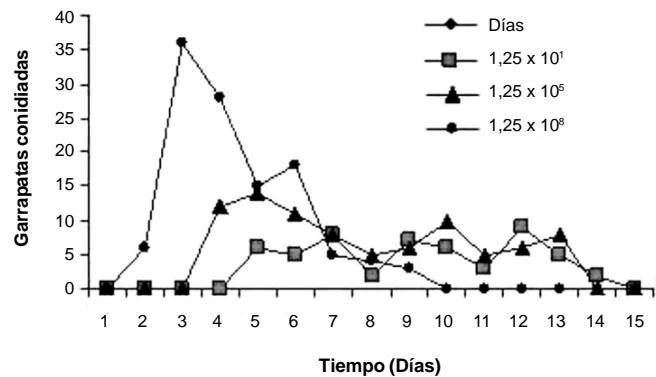


Figura 2. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para hembras teleginas de *B. microplus* inoculadas con el hongo *L. lecanii*.

Porcentaje de eclosión de huevos de *B. microplus* inoculados con *L. lecanii*. El porcentaje de eclosión, de la masa de huevos (0,1 g) al día ocho para la concentración $1,25 \times 10^8$ conidios/mL fue significativamente inferior al porcentaje para las demás concentraciones. (ANOVA Concentración: $F_{3,36} = 12,2$; $P < 0,001$). Khodadad *et al.* (2007) en un estudio en Irán al evaluar el efecto de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos; *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *L. psalliotae* sobre los huevos de *R.(B.) annulatus* a una concentración de 10^7 conidios/ml encontraron que dichos hongos disminuyeron el porcentaje de eclosión de los huevos siendo de 89,1%, 35,5% y 56,3% para cada especie.

Tabla 3. Estadísticos descriptivos para la supervivencia de garrapatas hembras inoculadas con *L. lecanii*, durante 21 días ($n = 120$).

Dosificación	Media \pm DE	TL ₅₀ (Mediana)
Testigo	20,2 \pm 1,7	21
1,25 x 10 ¹	17,9 \pm 3,7	19
1,25 x 10 ⁵	15,6 \pm 4,0	15
1,25 x 10 ⁸	9,3 \pm 2,6	10

Tabla 4. Causa y frecuencia de muerte de las garrapatas hembras inoculadas con las diferentes concentraciones del hongo *L. lecanii*.

Causa de muerte	Testigos	1,25x10 ¹	1,25x10 ⁵	1,25x10 ⁸
<i>L. lecanii</i>	0 (0%)	53 (44,2%)	85 (70,8%)	115 (95,8%)
Otros hongos o bacterias	54 (45%)	67 (55,8)	35 (29,2%)	5 (4,2%)
Causas naturales	66 (55%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	120	120	120	120

Con respecto al porcentaje de supervivencia de las larvas provenientes de huevos de *B. microplus*, 21 días después de inoculación, los resultados mostraron que la concentración 1,25 x 10⁸ conidios/mL presentó un porcentaje significativamente inferior al de las otras concentraciones (ANOVA Concentración: F_{3,36} = 94,5; P < 0,001). Este resultado se esperaba dado que las concentraciones mayores del hongo entomopatógeno poseen una mayor cantidad de conidios que se adhieren a la cutícula de la garrapata aumentando las probabilidades de que un mayor número de propágulos infectivos penetren y se multipliquen dentro del cuerpo de la garrapata, ocasionando daños, ya sea mecánicos (destrucción de tejidos), deficiencias nutricionales o liberación de toxinas que disminuyen la supervivencia (Steinhaus 1949; Tanada y Kaya 1993). Igualmente la densidad de los conidios debe lograr un umbral para alcanzar una efectiva penetración a la cutícula de la garrapata y la

posterior muerte del hospedero (Benjamín *et al.* 2002). Cardona (2005), utilizando masas de huevos de 2,85 g e inoculándolas a la concentración 1,25 x 10⁸ conidios/mL con *M. anisopliae* y *B. bassiana* en condiciones de laboratorio, encontró porcentajes de mortalidad superiores al 95% para ambos hongos.

Conclusiones

El uso de hongos entomopatógenos, la aplicación de extractos vegetales, el pastoreo conjunto o alternado con animales no aptos para la garrapata, así como la utilización de una vacuna antigarrapaticida, son alternativas de control que se hallan bajo evaluación. Los resultados del presente trabajo sugieren que el aislado de *L. lecanii* (CIAT 215) debería ser probado en campo; en condiciones *in Vitro* el hongo mostró ser efectivo contra hembras teleoginas de *B. microplus* especialmente en la concentración 1,25 x 10⁸ conidios/mL que indujo un 100% mortalidad, un menor tiempo de supervivencia, un menor tiempo de oviposición y de eclosión de huevos provenientes de teleoginas de *B. microplus* inoculadas. Además, la habilidad de este aislado para penetrar la cutícula de garrapatas adultas y la duración del proceso de invasión total que para este caso fue entre el noveno y catorceavo día postinoculación, podría permitir en campo que garrapatas infectadas inoculen a las no infectadas.

Debido a la importancia económica que *B. microplus* representa al ser uno de los principales ectoparásitos presentes en la ganadería bovina, el estudio sobre su biología contribuye al mejor diseño de estrategias de control de esta garrapata. Más investigaciones sobre sus enemigos naturales, bioecología y dinámica de poblaciones permitirán mejorar puntos clave en los programas de control.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los profesores Abel Díaz Cadavid por el análisis estadístico y la redacción de los resultados, Sandra Uribe Soto, Fabio Pineda Gutiérrez y Duverney Chaverra Rodríguez por las correcciones y aportes científicos a este manuscrito, Edison Cardona Zuluaga por el planteamiento y sugerencias al proyecto. A los compañeros del laboratorio de Micología y Microbiología de la Universidad de Antioquia por el soporte técnico y logístico en el desarrollo de esta investigación. A Jorge Henao y a Saulo Correa Zapata por el soporte técnico del equipo utilizado en esta investigación. Se agradece a la Corporación para el Estudio de Patologías Tropicales y al Instituto de Biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Antioquia por el apoyo logístico y técnico.

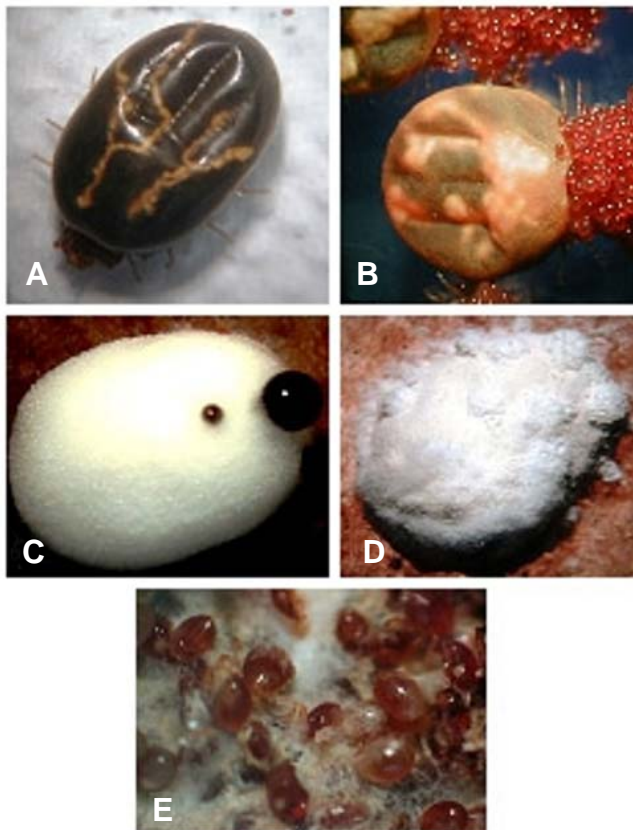


Figura 3. A. Hembra de *B. Microplus*. B. huevos testigo. C. y D. *B. microplus* invadido con *L. lecanii*. E. Huevos de *B. microplus* invadidos con *L. lecanii*.

Literatura citada

- ARMENDÁRIZ, G. I. 2003. Informe de un caso de resistencia múltiple a ixodícidas en *Boophilus microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae) en Tamaulipas, México. *Veterinaria México* 34 (4): 397-401.
- BARNETT, H. L. 1967. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company, Minneapolis (U.S.A). 225 p.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. 2003. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. The American Pathology Society. Minnesota, Estados Unidos. 218 p.
- BARRANCO, F. J. E.; ALATORRE, R. R. M.; GUTIÉRREZ, R. G.; VINIEGRA, G. G.; SAUCEDO, C. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 910-915.
- BENAVIDES, E. 1983. Observaciones sobre la fase no parasítica del ciclo evolutivo de *Boophilus microplus* en la altillanura plana colombiana. *Revista ICA*. 18 Número Extraordinario: 513-524.
- BENAVIDES, E.; ROMERO, N. A.; RODRÍGUEZ, B. J. 1999. Situación actual de resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a acaricidas. Primera parte. Carta Fedegán. Santa Fé de Bogotá, Colombia 59: 7-22.
- BENJAMÍN, M.; ZHIOUA, E.; OSTFELD, R. 2002. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 39 (5): 723-728.
- CALLE, J. 2000. Vers um controle Microbiologique des populations Colombiennes de Triatomineae, insectes vecteurs de la maladie de chagas. Tesis presentada para obtener el título de Doctor de la Universidad de Paris V.-René Descartes-Facultad de Medicina Necker. 141 p.
- CARDONA, Z. A. 2005. Evaluación de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* sobre los estados de desarrollo de *Boophilus microplus*. Tesis de investigación presentada como requisito para optar al título de Magister en Entomología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. 73 p.
- CORONADO, A.; MUJICA, F.; HENRÍQUEZ, H.; TRIANA, D.; ALVARADO J. 1997. Efecto de factores abióticos en la oviposición de *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) bajo condiciones de laboratorio. *Revista Científica (Maracaibo) FCV-LUZ* 7 (2): 87-91.
- DE LA CRUZ, M. J.; VAHOS, Z. R. 2004. Evaluación de los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* para el control de la garrapata *Boophilus microplus* a nivel de campo. *Revista de Investigaciones (Santa Fé de Bogotá)* 3 (1): 75-94.
- DÍAZ, Z. J.; CHUQUIYAURY, T. M. 2002. Estudio de los hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii*) como controladores biológicos de la garrapata (*Boophilus microplus*) en el ganado vacuno. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; Universidad Nacional "Hermilio Valdizán, Huanuco". Asociación Peruana de Producción Animal APPA. 5 p.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W. 1993. Compendium of soil fungi. Traute Heidi Anderson. IHW Verlag. 1: 859 p.
- FAO. 2003. Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. Título de la serie: ESTUDIOS FAO: Producción y Sanidad Animal 157- Dirección de Producción y Salud Animal. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. 64 p.
- FRAGAS, I.; GEMA, G. F.; HIDALGO, L. 2006. Formulación de hongos entomopatógenos como control biológico. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. La Habana, Cuba. <<http://appaperu.org/appa2002/invpdf/sani/85Sanal.pdf>> Fecha último acceso: [15-dic-2006].
- GALLARDO, V. J. S.; MORALES, J. 1999. *Boophilus microplus* (acari: Ixodidae): preoviposición, oviposición, incubación de los huevos y geotropismo. *Bioagro* 11 (3): 77-87.
- GARCÍA, Z. 2002. Diagnóstico enzimático para identificar la resistencia de garrapatas a los productos químicos utilizados para su control. Ficha Tecnológica. CENID- Parasitología Veterinaria. INIFAP: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 2 p.
- GOETTEL, M.; INGLIS, G. D. 1997. Fungi Hyphomycetes, pp. 213-249. En: Lawrence Lacey (ed.). Manual of techniques in insect pathology. USDA, ARS. Great Britain Academia Press.
- HUMBER, R. A. 1997. Fungi Identification, pp. 153-185. En: Lawrence Lacey (ed.). Manual of techniques in insect pathology. USDA, ARS. Great Britain Academia Press.
- KHODADAD, P. K.; HAMIDREZA, H.; MEHDI, R. A.; SAEED, B.; RASOUL, Z.; MEHRAN, G.; MASOOMEH, S. G. 2007. Biological control of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* by different strains of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium psalliotae* fungi. *Parasitology Research* 100 (6): 1297-1302.
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. 2001. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. Ninth Edition. CABI Publishing. 655 p.
- JONSSON, N. 2004. Integrated control programs for ticks on cattle: An: Examination of some possible components. FAO Animal Production and Health Paper. School of Veterinary Science, University of Queensland, Australia. 82 p.
- LAMBERTI, J. C.; BULMAN, G. M. 2002. Eficacia de cipermetrina y clorpirifos en pour-on frente a *Boophilus microplus*: Estudios en Brasil y Argentina. Trabajo presentado en Poster en el XXIº Congreso Brasileiro de Parasitología Veterinaria, en Río de Janeiro, 2-5 de septiembre, 2002.
- LÓPEZ, G. 1980. Biología, morfología y taxonomía de garrapatas de interés económico, pp. 1-16. En: Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) Regional 4. (ed.). Control de garrapatas. Medellín, Colombia. Compendium 39: 171 p.
- MARÍN, R. F. 2002. Biología, control y resistencia en garrapatas *Boophilus microplus*. Curso - Taller Sobre "Manejo de Ganado Bovino, Ovino y Caprino". p. 61- 71.
- MARTÍNEZ, I. F.; ORTIZ, N. A.; GILES, H. I.; DE LABRA, V. G.; FRAGOSO, S. H.; NERI, O. S. 2002. Comparación biológica de cuatro ivermectinas al 1% para el control de la garrapata *Boophilus microplus*, mediante pruebas de campo. XXVI Congreso Nacional de BUIATRIA. Asociación Mexicana de Médicos veterinarios especialistas en bovinos A.C. Acapulco, Guerrero, México. 2 p.
- OBREGÓN G. M. 2002. Uso de microorganismos en el combate de patógenos e insectos en los cultivos agrícolas. Núcleo Agropecuario. Centro Nacional especializado en agricultura orgánica. Instituto Nacional de Aprendizaje INA. Técnica (Costa Rica) 7 (3): 16-25.
- PARRA, T. M.; PELÁEZ, S. L.; SEGURA, C. F.; ARCOS, D. J.; LONDOÑO, A. J.; DÍAZ, R. E.; VANEGAS, R. M. 1999. Manejo Integrado de garrapatas en bovinos. Módulo Instruccional. Publicación de CORPOICA, Regional 6. 80 p.
- PÉREZ, L. E. 1997. Desarrollo para evaluar virulencia de *Verticillium lecanii* sobre *Myzus persicae* y *Trialeurodes vaporariorum*. Tesis Magíster en entomología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. 79 p.
- RAYMOND, K.; ROJAS, F.; BENAVIDES, E.; COTES, A. M.; VILLAMIZAR, L.; RONDEROS, V.; GARCÍA, P. 2004. Efecto de hongos entomopatógenos sobre la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Acari: Ixodida): Uso de activadores de patogenicidad. *Revista Colombiana de Entomología* 30 (1): 1-6
- RIJO, C. E.; NAVARRO, G.; RODRÍGUEZ, R. M.; MURILLO, E. Y. 1998. Efectividad de *Verticillium lecanii* sobre la fase parasítica de la garrapata *Boophilus microplus* (Acari: Metastigmata: Ixodidae). *Revista Colombiana de Entomología* 24 (1-2): 67-69.
- SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; OORSCHOT, A. N. 1984. Introduction to food - borne fungi. Second edition. Central bureau voor Schimmelcultures. Institute of the Royal Netherlands. Academy of arts and sciences. 247 p.

- STEINHAUS, E. A. 1949. Principles of insect pathology. Chapter 10 Fungous infections (Mycoses), pp. 318-416. McGraw-Hill Book Company, Inc. United States of America. 757 p.
- TANADA, Y.; KAYA, H. K. 1993. Insect pathology. Chapter 10 Fungal infections, pp. 318-387. Academia Press, Inc. Harcourt Brace Javanovich. Printed United States of America. 666 p.
- VITORTE, S. E.; RIJO, C. E.; LUJÁN, M. M.; TOLEDO, D. C.; MARTÍNEZ, R. J. 1998. Biopesticida a base de *Verticillium lecanii* para el control biológico de garrapatas. Certificado de Autor de Invención. República de Cuba. 8 p.
- VITORTE, S. E.; RIJO, C. E.; LUJÁN, M. M.; TOLEDO, D. C.; MARTÍNEZ, R. J. 2003. Biopesticida a base de *Verticillium lecanii* para la lucha biológica contra garrapatas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. República de Cuba. Escuela de Medicina Veterinaria Universidad Nacional. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Boletín de Parasitología 4 (1): 4.

Recibido: 4-ene-2007 • Aceptado: 24-mar-2008