

Evaluación *in vitro* del efecto de *Cordyceps (Beauveria) bassiana* en el control biológico de la fase adulta de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

**DIEGO JOSÉ GARCIA CORREDOR
M.V.Z**

**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
TUNJA, 2013**

Evaluación *in vitro* del efecto de *Cordyceps (Beauveria) bassiana* en el control biológico de la fase adulta de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

DIEGO JOSÉ GARCIA CORREDOR
M.V.Z

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de Maestro en Ciencias Biológicas

Director
ROY JOSÉ ANDRADE BECERRA
M.V, MSc, PhD

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
TUNJA, 2013

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la eficacia *in vitro* de *Cordyceps (Beauveria) bassiana* en el control biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Se recolectaron garrapatas hembras adultas pletóricas (0.200-0.250 gr.) de bovinos de la provincia de Ricaurte en el departamento de Boyacá, a las cuáles se les aplicó la técnica de inmersión de adultas de Drummond durante 60 segundos con tres concentraciones del hongo, 10^4 esporas/ml, 10^6 esporas/ml y 10^8 esporas/ml, en el tratamiento control se utilizó agua destilada. La concentración de 10^8 esporas/ml fue la que presentó los mejores resultados en cada una de las variables evaluadas: presencia de micosis (100%), garrapatas muertas por tratamiento (30/30), efecto sobre la reproducción estimada (60,17%), disminución de la ovoposición (40,33%) y porcentaje de eclosión de huevos (24,33%). La efectividad presentada por *C. (B.) bassiana* sobre *R. (B.) microplus* abre la opción a un nuevo método de control para los problemas causados por garrapatas dentro de las explotaciones bovinas.

Palabras clave: Bovinos, control biológico, garrapatas, micosis. (Fuente: DeCS)

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	12
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	16
2.1 HIPÓTESIS	16
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. OBJETIVOS	19
4.1 OBJETIVO GENERAL	19
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5. ANTECEDENTES	20
6. MARCO TEÓRICO	22
6.1 ASPECTOS GENERALES DE <i>Rhipicephalus (Boophilus)</i> <i>microplus</i>	22
6.2 CARACTERÍSTICAS RELEVANTES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	23
6.3 ASPECTOS BIOLÓGICOS DE <i>Rhipicephalus (Boophilus)</i> <i>microplus</i>	24
6.4 MÉTODOS DE CONTROL DE <i>Rhipicephalus (Boophilus)</i> <i>microplus</i>	25
6.4.1 Control químico de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	25
6.4.4.1 Resistencia de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> a plaguicidas.	25

CONTENIDO (Cont.)

	pág.
6.4.2 Control biológico de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	26
6.4.2.1 Hongos entomopatógenos	26
6.4.2.2 <i>Cordyceps (Beauveria) bassiana</i>	26
7. METODOLOGÍA	28
7.1 LUGAR DE EXPERIMENTACIÓN	28
7.2 CEPA DE <i>Cordyceps (Beauveria) bassiana</i> Y CONDICIONES DE CULTIVO	28
7.3 EVALUACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS	28
7.4 TRATAMIENTOS	29
7.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	29
7.6 DISEÑO EXPERIMENTAL	31
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
8.1 EFECTO DE <i>C. (B.) bassiana</i> EN GARRAPATAS ADULTAS Y PARAMETROS REPRODUCTIVOS DE <i>R. (B.) microplus</i>	32
8.1.1 Efecto de <i>C. (B.) bassiana</i> en garrapatas adultas de <i>R. (B.) microplus</i>	32
8.1.2 Efecto de <i>C. (B.) bassiana</i> sobre la ovoposición y eclosión de huevos en <i>R. (B.) microplus</i>	36
9. CONCLUSIONES	41
10. RECOMENDACIONES	42
11. BIBLIOGRAFIA	43

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Porcentaje de garrapatas <i>R. (B.) microplus</i> muertas por día en cada uno de los tratamientos.	35
Figura 2. Porcentaje de garrapatas <i>R. (B.) microplus</i> con micosis en cada uno de los tratamientos.	36
Figura 3. Reproducción estimada (OP) de garrapatas <i>R. (B.) microplus</i> tratadas con <i>C. (B.) bassiana</i>	38
Figura 4. Efecto de <i>C. (B.) bassiana</i> sobre la inhibición de la ovoposición (%IP) en garrapatas <i>R. (B.) microplus</i> para cada uno de los tratamientos	39
Figura 5. Porcentaje de emergencia de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> en cada uno de los tratamientos	39

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Peso en gramos de hembras de <i>R. (B.) microplus</i> por tratamiento en cada una de las replicas.....	29
Tabla 2. Día de muerte del total de garrapatas <i>R. (B.) microplus</i> sometidas a diferentes tratamientos con <i>C. (B.) bassiana</i>	33
Tabla 3. Análisis de varianza del número de garrapatas con desarrollo de micosis luego de ser sometidas a diferentes concentraciones de <i>C. (B.) bassiana</i>	34
Tabla 4. Efecto de <i>C. (B.) bassiana</i> sobre la reproducción estimada (OP) y el porcentaje de inhibición de la ovoposición (%IP) en garrapatas <i>R. (B.) microplus</i>	37

INTRODUCCION

Rhipicephalus (Boophilus) microplus es una garrapata de un hospedero que se encuentra distribuida en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Murrel y Barker, 2003). La infestación de bovinos con *R. (B.) microplus* representa un impacto económico significativo debido a la reducción de ganancia de peso y producción de leche. Además, la garrapata es potencial transmisor de agentes patógenos causantes de enfermedades como anaplasmosis y babesiosis, además de algunas antropozoonosis, amenazando seriamente no sólo la producción ganadera, sino también a los seres humanos (Ming *et al.*, 2013).

El control de las infestaciones de garrapatas ha sido difícil porque estas cuentan con pocos enemigos naturales, y por lo tanto, los métodos de control actuales se basan en la aplicación regular de acaricidas químicos. Sin embargo, el uso continuo de acaricidas tiene efectos adversos, incluidos la presencia de residuos de medicamentos en productos como la leche y la carne (Sun *et al.*, 2010), la aparición de cepas de garrapatas resistentes a los productos químicos y la contaminación ambiental. Estos efectos motivaron la búsqueda de métodos de control alternativos, destacándose la elaboración de vacunas antigarrapatas, la presencia de razas de bovinos resistentes dentro de las explotaciones pecuarias, y el control biológico (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005).

Los hongos entomopatógenos son considerados como enemigos naturales de gran importancia en el control de artrópodos, por lo que pueden ser utilizados como control biológico de garrapatas. Recientemente, los esfuerzos se han enfocado en la evaluación del potencial de los hongos como agente de control biológico contra artrópodos (Fernandes y Bittencourt, 2008); *Cordyceps (Beauveria) bassiana* se perfila como una alternativa eficaz para el control de *R. (B.) microplus*, buscando dar solución a un problema que aqueja a las

producciones bovinas del mundo (Paião *et al.*, 2001; Yao y Huang, 2004; Ming *et al.*, 2013).

Diversos estudios han destacado la importancia de *C. (B.) bassiana* como método de control de agentes patógenos en el área agrícola y pecuaria alrededor del mundo (Sagüés *et al.*, 2011; Okamoto y Amarasekare, 2012). El uso de este hongo como método de control de *R. (B.) microplus* en la actualidad es limitado debido al desconocimiento del efecto que produce sobre este ectoparásito (Fernández *et al.*, 2010); en Boyacá, no se habían realizado estudios que pudieran determinar y evaluar el control de este hongo sobre garrapatas *R. (B.) microplus*. Con la realización de esta investigación se quiere dar a conocer la funcionalidad *in vitro* de *C. (B.) bassiana* como control biológico de *R. (B.) microplus*, brindando así una alternativa que sea eficaz en la disminución de los daños ocasionados por esta garrapata al interior de las explotaciones bovinas.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La garrapata *R. (B.) microplus* se considera como el ectoparásito más importante del ganado bovino, su presencia en las explotaciones ganaderas reduce la producción ocasionando pérdida de peso en los animales, además de disminución en la producción de leche. Su mayor importancia radica en ser vector de enfermedades limitantes en el trópico como la anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) y la babesiosis (*Babesia bovis*, *Babesia bigemina*) (Fernández *et al.*, 2010); la presencia de este ectoparásito ocasiona gran impacto a nivel económico dentro de las explotaciones ganaderas, a nivel mundial se registran pérdidas entre 2000 a 3000 millones de dólares (FAO, 2007), mientras en Colombia las pérdidas ascienden a 76.713 millones de pesos por año (Benavides, 2001).

El uso inadecuado e indiscriminado de los métodos de control usados comúnmente en *R. (B.) microplus*, ha ocasionado múltiples problemas en el manejo de las garrapatas, ya que desde hace varios años se está registrando desarrollo de resistencia por parte de estos parásitos a varias de las sustancias de síntesis química como organofosforados (OP), piretroides sintéticos (SP), amidinas (Am) y lactonas macrocíclicas (ML) (Rosario y Hernández, 2001; Aguilar y Rodríguez, 2003; Alonso-Díaz *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2011); además es mayor la demanda a nivel mundial por el consumo de alimentos libres de químicos y existe especial cuidado en el impacto que estas sustancias pueden ocasionar en el medio ambiente al ser utilizadas de manera incorrecta (Ojeda-Chi, 2011).

Los efectos descritos anteriormente han motivado la búsqueda de métodos alternativos de control, donde se incluyen el desarrollo de vacunas antigarrapatas, la selección de razas de bovinos resistentes, y el control biológico (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005). Es así como el hongo *C. (B.) bassiana* se perfila como una alternativa eficaz de origen biológico para el control de *R. (B.) microplus*, buscando

mediante su uso dar solución a un problema que aqueja cada día más a las producciones bovinas del mundo y que se ve reflejado en la economía del productor.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Será el hongo entomopatógeno *C. (B.) bassiana* eficaz para producir alta mortalidad en garrapatas adultas de *R. (B.) microplus* y/o reducir su capacidad reproductiva?

2.1 HIPÓTESIS

C. (B.) bassiana ejerce control biológico sobre *R. (B.) microplus* al producirle alta mortalidad y disminuir su capacidad reproductiva.

3. JUSTIFICACIÓN

La garrapata *R. (B.) microplus* causa el mayor problema de ectoparasitosis en la ganadería bovina de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. El impacto económico que produce se debe a factores como el daño ocasionado en las pieles de los animales por acción de las picaduras, efectos tóxicos, pérdida de sangre, reducción en la producción de leche y carne, disminución en la producción de animales de reemplazo e incremento de los costos por el uso de métodos de control; además su importancia radica en los agentes etiológicos que transmiten, entre los que se encuentran virus, bacterias, rickettsias y protozoos (Ojeda-Chi, 2011).

El control de *R. (B.) microplus*, se realiza generalmente mediante la aplicación de acaricidas químicos que generan efectos adversos para el medio ambiente (Kay y Kemp, 1994), además de ser costosos. El uso desmedido de estos productos ha favorecido la aparición de resistencia a diversos acaricidas en poblaciones de *R. (B.) microplus* en todo el mundo, obligando a la búsqueda de nuevas opciones de control no químico, particularmente de origen biológico; una de las alternativas de control biológico que se ha explorado en los últimos años con resultados promisorios son los hongos entomopatógenos (De-Castro, 2007).

El hongo *C. (B.) bassiana* surge como una de las opciones para actuar como control biológico; diversos estudios han destacado la importancia de este hongo como método de control de agentes patógenos en el área agrícola y pecuaria alrededor del mundo (Saldarriaga y Vásquez, 2005; Orozco *et al.*, 2009; Sagüés *et al.*, 2011; Okamoto y Amarasekare, 2012). El uso de *C. (B.) bassiana* como método de control de *R. (B.) microplus* en la actualidad es limitado debido al desconocimiento del efecto que produce sobre este ectoparásito (Fernández *et al.*, 2010). Con la realización de esta investigación se pretende conocer la

funcionalidad de *C. (B.) bassiana* como control biológico de *R. (B.) microplus*, brindando así una alternativa que sea eficaz en la disminución de los daños ocasionados por esta garrapata al interior de las explotaciones bovinas.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia *in vitro* de *C. (B.) bassiana* en el control biológico de la fase adulta de *R. (B.) microplus*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la eficacia *in vitro* de *C. (B.) bassiana* sobre la mortalidad de la fase adulta de *R. (B.) microplus*.

Evaluar la eficacia *in vitro* de *C. (B.) bassiana* sobre el índice reproductivo (producción de huevos y eclosión de larvas) de *R. (B.) microplus*.

5. ANTECEDENTES

El control químico de garrapatas, aunque efectivo, ha disminuido parcialmente su éxito debido a que su utilización provoca serios problemas de contaminación de leche y carne debido a su toxicidad, causando efectos sobre la salud animal y humana, así como en el medio ambiente; sumado a lo anterior, se tienen registros acerca de la aparición de poblaciones de garrapatas resistentes a los acaricidas químicos, ocasionando que los productores eleven el número de aplicaciones por año, así como las dosis, desencadenando en el aumento de los costos centrados en el control de las garrapatas (Angus, 1996; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012).

Por lo anterior se buscan alternativas no químicas para el control de garrapatas, es el caso del hongo entomopatógeno *C. (B.) bassiana*, el cual surge como un método biológico de control de plagas. Durante años el uso de este hongo se restringió al control biológico de plagas de interés agrícola, ofreciendo una opción tan eficaz como los plaguicidas químicos utilizados comúnmente, disminuyendo costos de inversión en el manejo de agentes patógenos (Castiglioni *et al.*, 2003; Depieri *et al.*, 2005; Delgado y Murcia-Ordoñez, 2011). Luego, *C. (B.) bassiana* se presentó como un coadyuvante en el control parasitario en las explotaciones pecuarias, abriendo una posibilidad al manejo biológico de estas entidades, las cuales ya ofrecían niveles de resistencia a los tratamientos químicos a los que eran sometidos (Luz *et al.*, 1999; Cova *et al.*, 2009). Actualmente, diversos estudios revelan efectividad en cuanto a control biológico se refiere, del uso de *C. (B.) bassiana* sobre poblaciones de garrapatas de la familia Ixodidae, ya sea con aplicación de tratamientos basados únicamente en *C. (B.) bassiana* (Abigoudarzi *et al.*, 2009) o mediante su mezcla con otros productos de origen biológico como *Metarhizium anisopliae* (Bittencourt *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 1999; Stafford y Allan, 2010; Kaaya y Hedimbi, 2012).

En cuanto a *R. (B.) microplus*, se han realizado trabajos que favorecen la efectividad del uso de *C. (B.) bassiana* como alternativa de control biológico, observándose disminuciones relevantes en los porcentajes de ovoposición y eclosión de huevos, así como su efecto patógeno sobre ejemplares adultos de esta especie de garrapatas, ya sea mediante tratamientos combinados con otros productos biológicos (Fernández *et al.*, 2010; Sônia *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2012) como con tratamientos en los que únicamente se utilizó el hongo en cuestión (Campos *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 2010; Ming *et al.*, 2013).

En Colombia, *C. (B.) bassiana* es usado como control biológico de plagas en el sector agrícola, donde se observa alta efectividad sobre patógenos que afectan la producción de cultivos como el maíz y café, que sumado a la disminución en los costos de producción, hacen de este hongo un método de control ideal (Bustillo *et al.*, 2002). Sin embargo en el sector pecuario, y específicamente a nivel de control biológico en garrapata *R. (B.) microplus*, existe escasez de información relacionada con *C. (B.) bassiana* y su efecto sobre esta especie parasitaria, permitiendo dar paso a investigaciones que aclaren la funcionalidad de este hongo en los sistemas de producción bovina (Delgado y Murcia, 2011).

6. MARCO TEÓRICO

6.1 ASPECTOS GENERALES DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Las mayores pérdidas económicas en las ganaderías del mundo ocurren por la presencia de garrapatas. Su acción puede causar, pérdida de sangre, inoculación de agentes patógenos y toxinas y bajas en la productividad (Cordovés, 1997). Las garrapatas de la familia Ixodidae, son ectoparásitos hematófagos obligados durante algunos o en todos los estados posembrionarios. Son consideradas como el grupo de vectores de patógenos más importantes dentro del Phylum Arthropoda, siendo comparables con mosquitos de la Familia Culicidae (Hoogstraal, 2009). Varias especies son vectores de agentes causantes de enfermedades que pueden llevar a la muerte de su hospedero (Jongejan y Uilenberg, 2004).

R. (B.) microplus, fue introducida desde la India a muchas regiones de Asia tropical y subtropical, Nororiente de Australia, Madagascar, costas y tierras bajas del Nororiente de África y muchas regiones de Sur y Centro América, además del Caribe (Graf *et al.*, 1987). De acuerdo con Guglielmone *et al.* (2003), *R. (B.) microplus* está distribuida desde el norte de Argentina hasta México incluyendo las islas del Caribe. Estudios sobre el análisis de la distribución del subgénero *Boophilus* en África y América Latina, indican que en África esta especie se restringe a Madagascar, sudeste de África. En tanto que, en América latina *R. (B.) microplus* es abundante en el corredor mesoamericano entre Venezuela y Colombia y al sureste de Brasil y Argentina (Estrada-Peña *et al.*, 2006).

6.2 CARACTERÍSTICAS RELEVANTES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Existen aproximadamente 870 especies de garrapatas descritas en el mundo, agrupadas en el suborden Ixodida (Metastigmata) el cual incluye tres familias. La familia Ixodidae contiene las especies conocidas como garrapatas duras y de las cuales se conocen cerca de 683 especies (Estrada-Peña *et al.*, 2006). Guglielmone *et al.* (2004) indican que el subgénero *Boophilus* está representado por dos especies en América Latina: *R. (B.) microplus* y *R. (B.) annulatus*, esta última restringida al nordeste de México y a la región mediterránea del nuevo mundo y nunca se ha encontrado en la región Neotropical.

Morfológicamente, las especies de la familia Ixodidae se caracterizan por poseer capitulo siempre en posición terminal (visible dorsalmente) y escudo dorsal en todos los estados biológicos. El dimorfismo sexual es acentuado (escudo pequeño y corto en hembras, larvas y ninfas, no sobrepasando la región media del cuerpo; mientras que en machos el escudo es largo y se extiende hasta la margen posterior). En las hembras se observan áreas porosas; hipostoma denticulado en la mayoría de los géneros, en muy pocos casos con crenulaciones. El último artículo o segmento del palpo de la pata IV está en posición ventral, situado en una cavidad en la extremidad distal del artículo III. Las placas espirculares están situadas posteriores a la pata IV. Todas las especies de *Rhipicephalus* presentan coloración castaña a castaña rojiza, el escudo no es ornamentado, presentan ojos, rostro corto y base del capítulo hexagonal. Los machos poseen dos a cuatro placas adanales y algunos presentan apéndice caudal (Onofrio *et al.*, 2006).

Las características morfológicas que permiten separar a *R. (B.) microplus* de otras especies son la presencia de una proyección caudal en el macho, las espinas en la coxa I bien desarrolladas en las hembras, capitulo corto, palpos ligeramente más cortos que el hipostoma, algunas veces puede presentar dientes 5/5 ó 4/5,

ausencia de festones, placas espiriculares ovales similares en ambos sexos y hasta 4 placas adanales en los machos bien desarrolladas (Guglielmone *et al.*, 2006).

6.3 ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

La garrapata *R. (B.) microplus*, es una especie típicamente monoxena (un solo hospedero). Las larvas infestan al ganado en el pasto y se alimentan por 6 a 8 días hasta que sufren la muda para ninfas, las cuales alcanzan el estado adulto entre 7 a 9 días. La hembra fertilizada ingurgita y cae al suelo para realizar su ovoposición. Los machos permanecen sexualmente activos sobre el hospedero hasta por 70 días. El periodo total del parasitismo (desde larva no alimentada hasta hembra ingurgitada) varía de 18 a 22 días, pudiéndose extender hasta 30 días. La fase de parasitismo es poco influenciada por las condiciones climáticas, contrario a lo que ocurre en la fase no parasitaria que si está influenciada por las condiciones ambientales. En condiciones de alta humedad relativa y temperatura entre 24 a 28°C, una hembra ingurgitada puede transformar entre el 50 al 60% de su peso corporal en huevos (2000 a 4000 huevos por hembra), con una tasa de eclosión de 85 a 95%. Las larvas pueden sobrevivir sin alimento por 30 días en ambientes calientes y más de 120 días en temperaturas bajas (Onofrio *et al.*, 2006).

R. (B.) microplus es vector de la enfermedad conocida como tristeza parasitaria bovina, causada por protozoarios del género *Babesia* y bacterias del género *Anaplasma*. Los protozoos *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* son transmitidos por la hembra ingurgitada a los huevos por vía transovarica. *Babesia bovis* es transmitido al ganado por las larvas infectadas y *Babesia bigemina* solamente es transmitida por ninfas y adultos (Guglielmone *et al.*, 2006).

6.4 MÉTODOS DE CONTROL DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

El control de *R. (B.) microplus* en el centro y sur del continente Americano, representa uno de los grandes retos de la producción bovina. Aunque el ganado vacuno representa su hospedero preferido, puede tener hospederos alternos como equinos, ovinos, caprinos, venados y otros (Castro-Silva *et al.*, 2009). El control de estas garrapatas ha sido realizado con el uso intensivo de acaricidas sintéticos, los cuales se emplean en diferentes dosis y diferentes formas (Vargas *et al.*, 2003; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006). Las continuas aplicaciones de estos productos ha causado el desarrollo de resistencia a organofosforados y piretroides, lo cual es una de las principales preocupaciones de los ganaderos (Patarroyo *et al.*, 2009). En diversas regiones las investigaciones se han dirigido a buscar nuevas alternativas para el control de garrapatas como el uso de agentes biológicos entomopatógenos como hongos o extractos de plantas (Ojeda-Chi *et al.*, 2010; Rosado-Aguilar *et al.*, 2010).

6.4.1 Control químico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Hasta el momento, el control de garrapatas ha sido realizado con el uso continuo de productos de los grupos de organofosforados (OP), piretroides sintéticos (SP), amidinas (Am) y lactonas macrocíclicas (ML) (Aguilar y Rodríguez, 2003; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012). La eficacia de algunos de estos productos en reducir las poblaciones de garrapatas se ha visto limitada por el desarrollo de resistencia de la plaga, eliminación de organismos que no son el blanco, muchos de ellos agentes de control biológico, problemas de contaminación ambiental y peor aún, contaminación por residuos de plaguicidas en leche y carne (Graf *et al.*, 2004). Según registros de la FAO (2007) en India las especies de garrapatas han desarrollado resistencia a todos los productos acaricidas comúnmente usados.

6.4.4.1 Resistencia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a plaguicidas. Los acaricidas han jugado un papel muy importante en el control de garrapatas;

sin embargo, como consecuencia de un uso extensivo de los químicos muchas especies de garrapatas han desarrollado resistencia a las diferentes clases de acaricidas en varios países del mundo (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012). La prueba con larvas (LPT) es la prueba propuesta como referencia para el diagnóstico de resistencia de poblaciones a OP y SP en garrapatas del ganado, las pruebas con larvas son particularmente eficientes para medir niveles de resistencia de poblaciones de garrapatas. La detección de la resistencia además del registro de los acaricidas usados ofrecen una valiosa información para el manejo y control de garrapatas y el monitoreo de la resistencia en campo (FAO, 2007). El desarrollo de la resistencia en una población de garrapatas depende de la frecuencia de los individuos resistentes en la población y la intensidad de la presión de selección realizada con químicos (Kunz y Kemp, 1994).

6.4.2 Control biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Debido a los múltiples problemas derivados del uso intensivo de químicos en garrapatas, se han desarrollado métodos alternativos de control como el uso de agentes biológicos como nematodos (Vasconceles *et al.*, 2004) y hongos entomopatógenos como *Cordyceps (Beauveria)* y *Metarhizium* (Gindin *et al.*, 2001; Polar *et al.*, 2005; Leemon *et al.*, 2008).

6.4.2.1 Hongos entomopatógenos. Se encargan de limitar la producción de artrópodos, plagas y organismos parásitos que generarán daños económicos en diversos campos como el agrícola y ganadero. Los hongos entomopatógenos tienen gran potencial para ser empleados como biocontroladores, siendo los más importantes *Metarhizium*, *Cordyceps (Beauveria)*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoopthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (Sagüés *et al.*, 2011).

6.4.2.2 *Cordyceps (Beauveria) bassiana*. Es un hongo Deuteromycete, perteneciente al reino Fungi, División Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden

Hypocreales, Familia Cordycipitaceae, Género *Cordyceps* (*Beauveria*). Presenta micelio blanco, conidióforos sencillos, pueden estar agrupados, los conidios son hialinos, redondos y tienen un tamaño de 3-6 μm de largo por 2,5-3,5 μm de ancho. Las colonias crecen de 0,6-2,3 cm en 8 días a 20 °C, tiene abundantes conidióforos con grupos de células fialídicas, células conidiógenas globosas y otras en forma de botella; genera colonias primero de color blanco y luego se tornan de un color amarillo-rosado presentando apariencia polvorosa. Para la germinación de conidios se requiere una temperatura de 25-30 °C y un pH de 5,7-5,9 (Li *et al.*, 2001; Campos *et al.*, 2005).

- Mecanismo de acción.

El propágulo infeccioso del hongo (conidia) se deposita en la parte externa de la garrapata (exoesqueleto) adhiriéndose a la misma (fase de adhesión), luego aparece el tubo germinativo (fase de germinación) y a partir de él, se desarrolla el apresorio, estructura celular que ejerce presión contra las capas serosas del exoesqueleto, al mismo tiempo que libera varios tipos de enzimas (quitinasas, cutinasas) las cuales producen la histólisis de los tejidos ablandándolos y permitiendo la infección del hongo (fase de infección). Una vez dentro del hemocele el hongo colonizará y se dispersa en la hemolinfa produciendo metabolitos secundarios (micotoxinas o beauvericina) que afectan los órganos y la función del organismo parasitado produciendo parálisis para luego morir en un período de 4-8 días. Por último se producen millones de conidios infecciosos, que servirán de inóculo secundario para infectar otros individuos (Fernández *et al.*, 2010).

7. METODOLOGÍA

7.1 LUGAR DE EXPERIMENTACIÓN

El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, sede central Tunja.

7.2 CEPA DE *Cordyceps (Beauveria) bassiana* Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se utilizó la cepa BbF2011 del hongo entomopatógeno *C. (B.) bassiana* originario de la Sabana de Bogotá, Colombia. El hongo fue aislado y depositado en la colección micológica de la Fundación de Asesorías para el Sector Rural Ciudad de Dios, FUNDASES. El crecimiento y reproducción del hongo se realizó en agar Saboraud dextrosa, enriquecido con 1% de extracto de levaduras y 500 ppm de cloranfenicol. Después se incubó a 25°C y 70% de humedad durante tres semanas. La cosecha de conidias se realizó por raspado y se suspendió en agua destilada estéril con Tween 80 al 1%. La concentración de conidias (1×10^4 , 1×10^6 y 1×10^8) se determinó de forma directa utilizando una cámara de Neubauer.

7.3 EVALUACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

Para la evaluación *in vitro* del efecto de *C. bassiana* sobre *R. (B.) microplus* se recolectaron garrapatas hembras adultas pletóricas (0,200-0,250 gr.) de bovinos de la provincia de Ricaurte en el departamento de Boyacá. Las garrapatas fueron depositadas en tubos de cristal con tapón de algodón para ser trasladadas al laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia para la aplicación de los tratamientos.

7.4 TRATAMIENTOS

Una vez registrado el ingreso de garrapatas al laboratorio estas fueron desinfectadas con cloro (1%) y posteriormente pesadas para formar los grupos (Tabla 1). Se empleó la técnica de inmersión de adultas (Drummond y Whetstone, 1969) para evaluar los tratamientos; los tratamientos fueron: al grupo I se le aplicó agua destilada con Twenn 80 al 1%, al grupo II se le aplicó *C. (B.) bassiana* a una concentración de 1×10^4 esporas/ml, al grupo III se le aplicó *C. (B.) bassiana* a una concentración de 1×10^6 esporas/ml, al grupo IV se le aplicó *C. (B.) bassiana* a una concentración de 1×10^8 esporas/ml. El primer grupo fue considerado como testigo. En todos los casos se utilizó la misma cantidad de líquido consistente en 1,5 ml del biopreparado.

Tabla 1. Peso promedio en gramos de hembras de *R. (B.) microplus* por tratamiento en cada una de las replicas

REPLICA / TRATAMIENTO	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Replica 1	2,173 gr	2,187 gr	2,179 gr	2,176 gr
Replica 2	2,098 gr	2,079 gr	2,089 gr	2,087 gr
Replica 3	2,176 gr	2,169 gr	2,177 gr	2,182 gr

7.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para evaluar el efecto de *C. (B.) bassiana* sobre *R. (B.) microplus*, su ovoposición (IO) y porcentaje eclosión (IE), se empleó la técnica de inmersión de hembras repletas (Drummond y Whetstone, 1969).

Se utilizaron 30 hembras de *R. (B.) microplus* con un rango de peso de 0,200 a

0,250 g por cada uno de los tratamientos a evaluar. Las garrapatas fueron sometidas a inmersión durante 60 segundos partiendo de una dosis de 1×10^4 esporas/ml hasta 1×10^8 esporas/ml, el tratamiento se administró individualmente en placas de cultivo de 24 pozos utilizando 1.5 ml del biopreparado. Una vez fuera de los pozos, las garrapatas se secaron e incubaron durante 20 días en cámara húmeda (90 % de humedad relativa) a 25 °C, se realizaron observaciones diarias al microestereoscopio para comprobar el desarrollo de micosis; se tuvo un grupo control que recibió tratamiento con agua destilada.

Para determinar el efecto de *C. (B.) bassiana* sobre la ovoposición de *R. (B.) microplus*, a los 14 días de incubación de las hembras repletas, se retiró la postura de cada una de ellas, pesando e incubando los huevos bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (28 °C y 85 % HR). Para realizar los cálculos del efecto del hongo sobre la ovoposición se obtuvo la relación del peso de huevos depositados / peso de las hembras por grupo y lote:

$$OP = \frac{(\text{Peso de huevos en gramos}) \times (20000)}{\text{Peso de hembras en gramos}} \times (100)$$

Una vez obtenido este parámetro, tanto para individuos tratados como para los del grupo testigo, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%IO = \frac{(OP/T - OP/t) \times (100)}{(OP/T)}$$

Dónde:

OP/T = Reproducción estimada del grupo testigo.

OP/t = Reproducción estimada del grupo tratado.

Para calcular la eclosión de larvas se tomaron cinco alícuotas y se realizó el

conteo de cascarones rotos y no rotos hasta completar 100 huevos contados, procedentes de una muestra de 1 gr de huevos incubada a 28 °C y 85 % HR por 35 días y previamente homogenizada. Con los resultados de los conteos se obtuvo el promedio de eclosión para los diferentes tratamientos.

7.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones, donde cada repetición constó de 10 garrapatas por tratamiento. Los datos fueron tabulados en Excel para posteriormente ser analizados en el programa estadístico Epidat 4.0

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 EFECTO DE *C. (B.) bassiana* EN GARRAPATAS ADULTAS Y PARAMETROS REPRODUCTIVOS DE *R. (B.) microplus*

Los hongos entomopatógenos presentan amplia distribución, bajo riesgo para los organismos no objetivo, seguridad ambiental y alta virulencia contra las garrapatas, por esto han sido rápidamente desarrollados para el control biológico de plagas. Diversos estudios han demostrado que la muerte de las garrapatas sometidas al efecto de estos hongos es debida generalmente a una combinación de acciones que incluyen el agotamiento de los nutrientes, obstrucción física, invasión de órganos o toxicosis (Fernandes *et al.*, 2012; Qiaoyun *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos permitieron determinar la eficiencia de *C. (B.) bassiana* sobre garrapatas adultas y los parámetros reproductivos de *R. (B.) microplus*. Se observaron efectos diferentes en cada una de las concentraciones utilizadas, presentándose cambios significativos en cada uno de los parámetros evaluados.

8.1.1 Efecto de *C. (B.) bassiana* en garrapatas adultas de *R. (B.) microplus*

Se encontró que en los tres tratamientos donde fue utilizado *C. (B.) bassiana* se produjo la muerte del total de las garrapatas antes de finalizar el experimento; teniendo en cuenta la prueba de medias (Tabla 2), en la concentración de 10^8 esporas/ml se presentó la tasa de mortalidad más alta en menor tiempo, observándose la muerte de todas las garrapatas (30/30) en el día 14,9 del experimento, seguida por la concentración de 10^6 esporas/ml y 10^4 esporas/ml (día 17,8 y 21,2 respectivamente), Para el tratamiento control se observó la muerte del 90% de las garrapatas (27/30) en el tiempo determinado para el desarrollo del trabajo (22 días). Aunque el inicio de las muertes en las garrapatas fue igual en

todos los tratamientos (día 4), la velocidad de presentación de este proceso fue mayor a medida que aumentó la concentración del hongo (Figura 1).

Tabla 2. Día en que se alcanzó el 100% de mortalidad de garrapatas *R. (B.) microplus* sometidas a diferentes tratamientos con *C. (B.) bassiana*

Tratamientos	Valores de la media*
10 ⁴ esporas/ml	21,2 a
10 ⁶ esporas/ml	17,8 b
10 ⁸ esporas/ml	14,9 c

*Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey <0.05)

En los tres tratamientos donde se utilizó *C. (B.) bassiana* se desarrolló micosis; siendo la concentración de 10⁸ esporas/ml la más efectiva, presentándose el desarrollo de esta entidad a partir del día 4 y logrando su pico máximo en el día 18 postratamiento, donde se observó micosis en el 100% de las garrapatas (30/30), seguida por la concentración de 10⁶ esporas/ml observando la acción del hongo el a partir del día 4, alcanzando el pico máximo de garrapatas con micosis (21/30) en el día 22 postratamiento, y finalmente la concentración de 10⁴ esporas/ml con presencia de micosis a partir del día 8 alcanzando un máximo de garrapatas en las que se observó la acción patógena de *C. (B.) bassiana* (12/30) en el día 20 postratamiento (Figura 2). El análisis de varianza, realizado con el desarrollo de micosis en cada uno de los tratamientos presentó diferencias significativas entre grupos e intra grupos (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de varianza del número de garrapatas con desarrollo de micosis luego de ser sometidas a diferentes concentraciones de *C. (B.) bassiana*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada
Entre grupos	11	315,64	286,94	4,87
Intra grupos	24	141,33	588,89	
Total (Corr.)	35	456,97		

Los resultados observados son similares a los valores encontrados por otros autores en trabajos análogos. La presencia de micosis observada en los grupos de garrapatas sometidas a *C. (B.) bassiana*, mas no en el control indica que el hongo, fue la causa de la muerte en adultas de *R. (B.) microplus* tratadas en el laboratorio. En este estudio se determinó que a mayor concentración de *C. (B.) bassiana*, se ejerce mayor efecto patógeno y en menor tiempo sobre garrapatas adultas de *R. (B.) microplus*. Es así como la concentración de 10^8 esporas/ml de *C. (B.) bassiana*, obtuvo la mayor efectividad entre los tratamientos empleados. Situación similar se presentó en los estudios realizados por Qiaoyun *et al.* (2012) y Sônia *et al.* (2012), donde se encontraron rangos de mortalidad del 44-100% bajo tratamiento con la misma concentración del hongo en adultos de *R. (B.) microplus*. Trabajos donde se utilizaron concentraciones diferentes de *C. (B.) bassiana* para el control biológico de garrapatas obtuvieron resultados similares a los presentados en este estudio, mostrando que a mayor concentración del hongo, mayor efecto patógeno (Fernández *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2011).

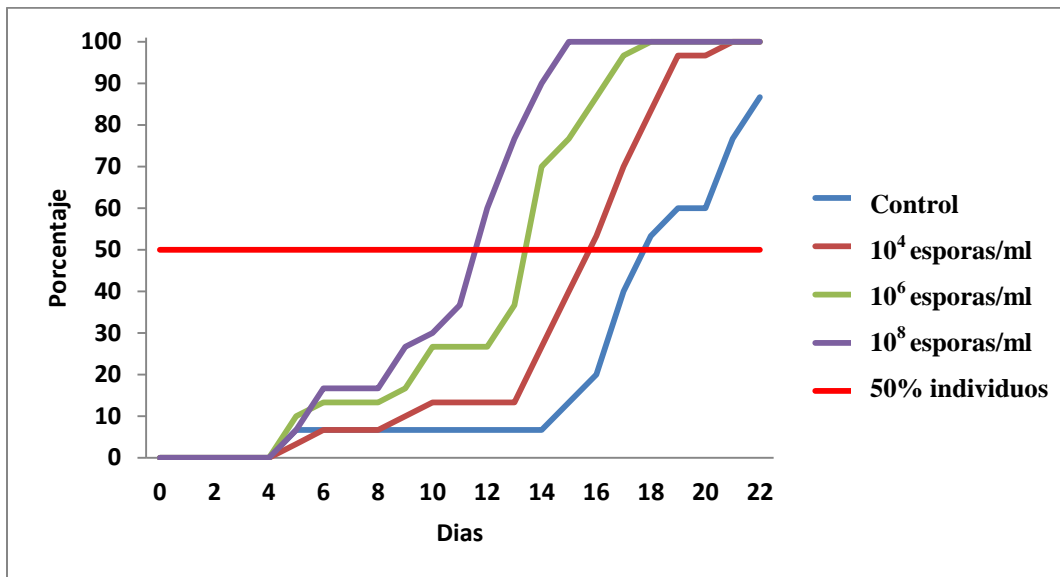


Figura 1. Porcentaje de garrapatas *R. (B.) microplus* muertas por día en cada uno de los tratamientos.

Los dos tratamientos restantes, aunque no presentaron resultados contundentes en la producción de micosis y muerte de ejemplares adultos de *R. (B.) microplus*, ratificaron que *C. (B.) bassiana* ejerce control biológico sobre esta especie de garrapata; las concentraciones utilizadas en este estudio deben ser tenidas en cuenta como complemento a los productos químicos y podrían ser usados no sólo para el control de este grupo parasitario, además que su uso podría disminuir el riesgo de generación de cepas de garrapatas resistentes al tratamiento químico (Abdigoudarzi *et al.*, 2009; Coya *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2011).

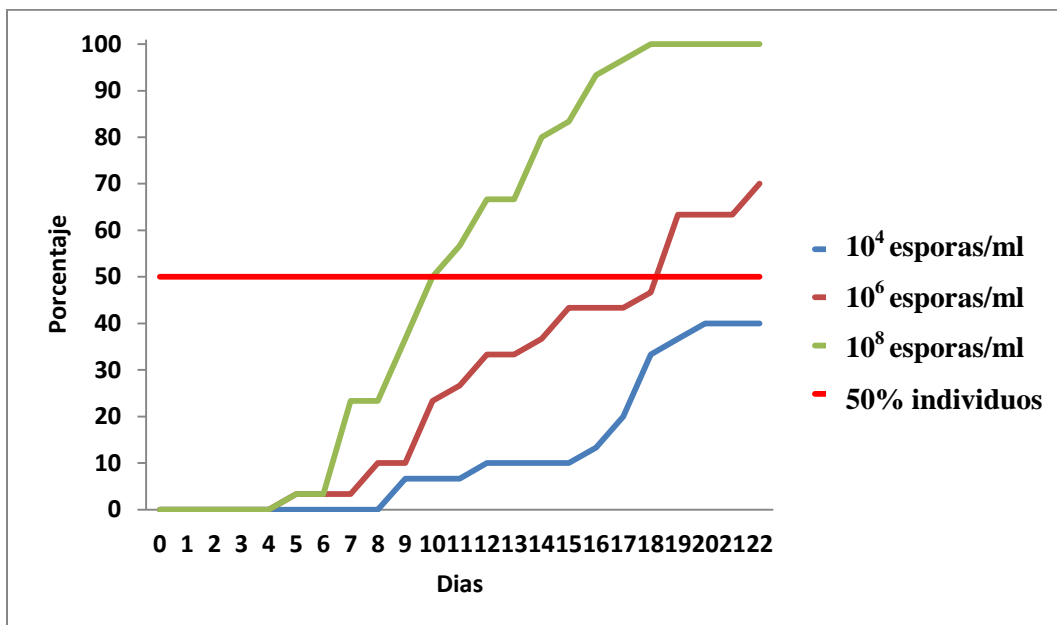


Figura 2. Porcentaje de garrapatas *R. (B.) microplus* con micosis en cada uno de los tratamientos (en el grupo control no se presentó micosis del hongo).

8.1.2 Efecto de *C. (B.) bassiana* sobre la ovoposición y eclosión de huevos en *R. (B.) microplus*

Los parámetros reproductivos mostraron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, siendo la mayor concentración de *C. (B.) bassiana* (10^8 esporas/ml) la que produjo los mayores efectos sobre las variables analizadas, observándose la disminución en la reproducción estimada en referencia al tratamiento control (60,17%) y el aumento en la inhibición de la ovoposición (40,33%) en garrapatas *R. (B.) microplus* (Figuras 3 y 4). Los resultados obtenidos mostraron ajuste en cuanto a las respuestas obtenidas por cada uno de los tratamientos en las variables analizadas.

Tabla 4. Efecto de *C. (B.) bassiana* sobre la reproducción estimada (RE) y el porcentaje de inhibición de la ovoposición (%IO) en garrapatas *R. (B.) microplus*

Tratamiento	Reproducción estimada (RE)	Inhibición de la ovoposición (%IO)
Control	720,768	
10 ⁴ esporas/ml	651,366	10
10 ⁶ esporas/ml	543,666	24,67
10 ⁸ esporas/ml	433,671	40,33

Se encontró que en los tres tratamientos donde se utilizó *C. (B.) bassiana* se redujo el porcentaje de eclosión de huevos, mostrando mayor efecto sobre este parámetro la concentración de 10⁸ esporas/ml observándose la eclosión de tan sólo el 24.33% de los huevos tras 35 días de incubación; seguida por la concentración de 10⁶ esporas/ml y 10⁴ esporas/ml (61% y 82,67% respectivamente), para el tratamiento control se observó la eclosión del 90,67% de los huevos. La emergencia de larvas de garrapatas tratadas con el hongo disminuyó a medida que la concentración del mismo aumentaba (Figura 5).

Las concentraciones mínimas requeridas para inhibir el potencial reproductivo (RE) en su totalidad, se encontraron fuera del alcance de las concentraciones de *C. (B.) bassiana* utilizadas en el presente estudio. Sin embargo, al tratarse de un método de control biológico, los resultados encontrados para controlar el potencial reproductivo fueron aceptables, teniendo en cuenta que la prueba utiliza garrapatas repletas, estadio en que son más tolerantes, por lo menos al control químico (Campos *et al.*, 2005; Ming *et al.*, 2011). Si bien es cierto que para suprimir la ovoposición se requieren concentraciones de los entomopatógenos elevadas (Sônia *et al.*, 2012), la eclosión se vio afectada con las concentraciones utilizadas, lo que no permitió la emergencia de larvas infestantes de manera normal, obteniendo un control aceptable sobre este parámetro. Es importante

resaltar este hecho debido a que al tratarse de un control no químico, el resultado encontrado muestra el potencial que presentan los hongos entomopatógenos en el control de garrapatas *R. (B.) microplus*, lo cual responde a las demandas existentes para combatir este problema dentro de las explotaciones bovinas, sin dejar atrás a los acaricidas químicos con los que podrían ser combinados (Fernandes *et al.*, 2012; Okamoto y Amarasekare, 2012; Perinotto *et al.*, 2012).

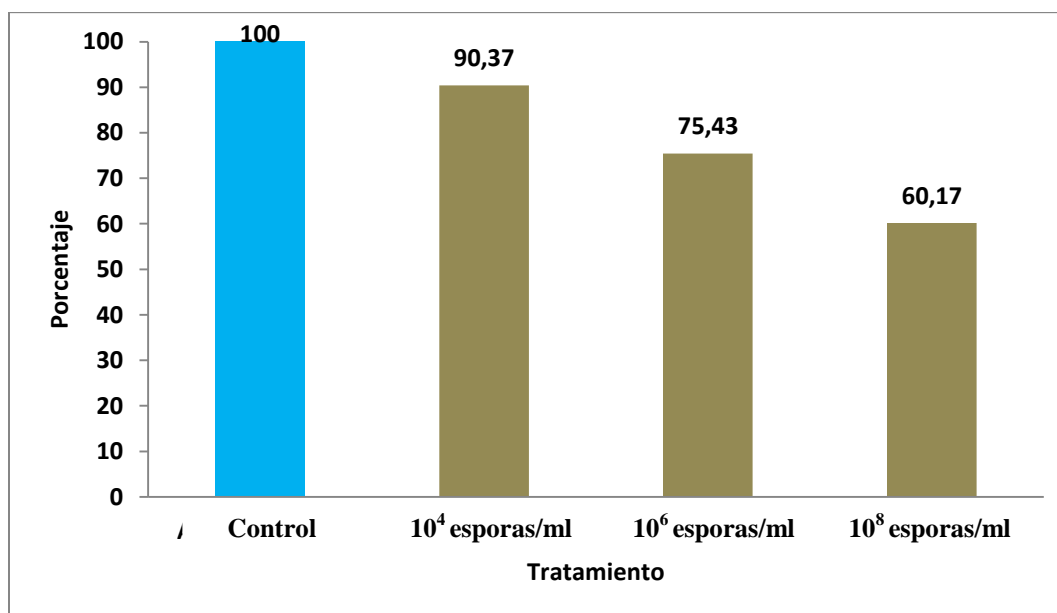


Figura 3. Reproducción estimada (RE) de garrapatas *R. (B.) microplus* tratadas con *C. (B.) bassiana*

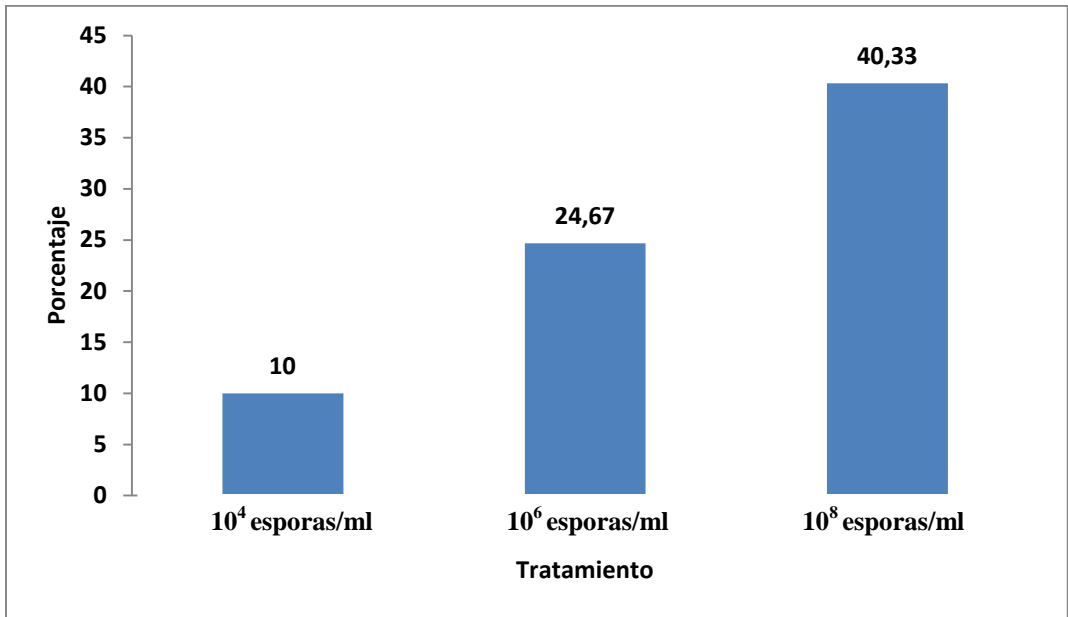


Figura 4. Efecto de *C. (B.) bassiana* sobre la inhibición de la ovoposición (%IO) en garrapatas *R. (B.) microplus* para cada uno de los tratamientos

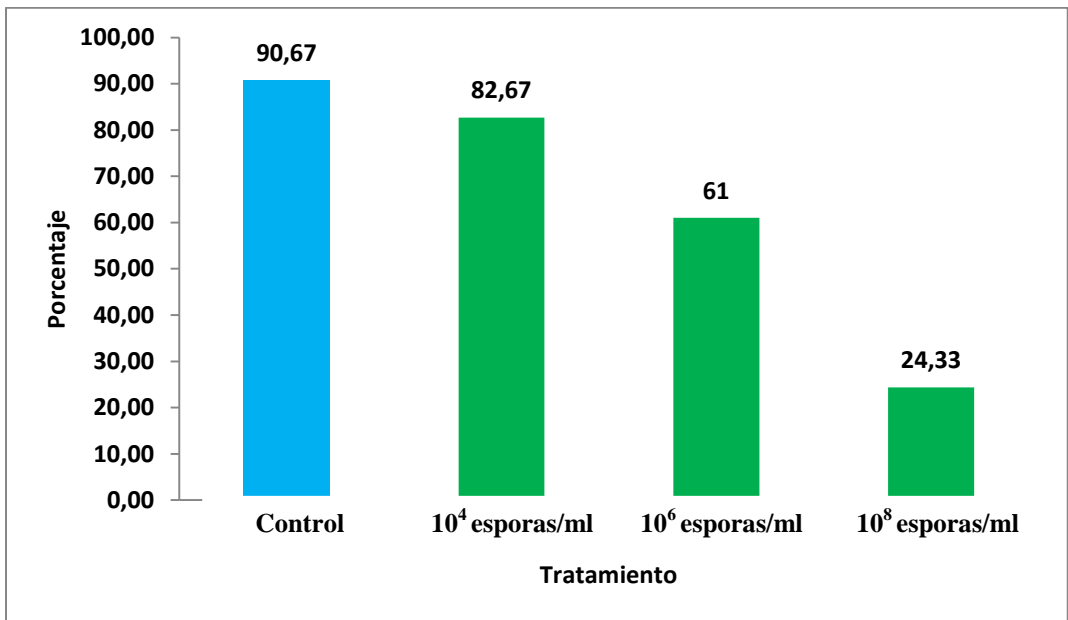


Figura 5. Porcentaje de emergencia de larvas de *R. (B.) microplus* en cada uno de los tratamientos.

Los ensayos realizados demuestran que el desempeño de las concentraciones es

variable, representando el mejor prospecto encontrado (10^8 esporas/ml de *C. (B.) bassiana*) una herramienta indispensable para futuros experimentos en bovinos infestados de forma artificial en confinamiento y naturalmente infestados en estudios de campo. No obstante que la aplicación de métodos de control no químico es una tendencia actual como parte del manejo integrado de plagas (Castiglioni *et al.*, 2003; De-Castro, 2007; Sun *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2011), se requiere realizar ensayos a nivel de campo que permitan evaluar bajo condiciones multifactoriales, formulaciones no sólo de *C. (B.) bassiana*, sino de otros hongos entomopatógenos que demuestren su viabilidad para el control de garrapatas en condiciones naturales. Esta característica resalta la importancia de ampliar este tipo de pruebas a regiones en donde se está aplicando el combate químico contra *R. (B.) microplus* y otras especies de garrapatas, permitiendo establecer estrategias de control y organización de los recursos disponibles de una forma más adecuada. Por último, cabe señalar que las posibles implicaciones de los resultados encontrados en el presente estudio, podrían involucrar tanto garrapatas como otras especies de parásitos y diferentes formas de utilización (Kanga *et al.*, 2003; De Souza-Basso *et al.*, 2005).

9. CONCLUSIONES

Se evidenció la efectividad *in vitro* de *C. (B.) bassiana* en el control biológico de *R. (B.) microplus*, siendo la concentración de 10^8 esporas/ml la que presentó los mejores resultados en las variables presencia de micosis, garrapatas muertas por tratamiento, reproducción estimada, inhibición de la ovoposición y porcentaje de eclosión de huevos, perfilándose como una opción para el control de este grupo parasitario.

Las concentraciones de *C. (B.) bassiana* utilizadas durante este estudio, a pesar de tener diferentes resultados para cada una de ellas, abren la opción a un nuevo método de control de los problemas causados por las garrapatas dentro de las explotaciones bovinas; sin dejar a un lado el control químico y manejando asociaciones entre los dos métodos es posible obtener mejores resultados que permitan no sólo controlar los agentes parasitarios, sino atenuar el efecto que producen los productos químicos sobre el medio ambiente además de disminuir el riesgo de presentación de cepas de garrapatas resistentes a dichos productos.

10. RECOMENDACIONES

Es indispensable la realización de estudios *in vivo*, tanto en animales infectados artificialmente y manejados en establo, como en animales con infección natural en campo, buscando evaluar la eficacia de *C. (B.) bassiana* en condiciones ambientales no controladas sobre *R. (B.) microplus*.

Si bien se logró demostrar la eficacia del hongo en *R. (B.) microplus* es necesario realizar ensayos que permitan evaluar el efecto de *C. (B.) bassiana* en otras especies de garrapatas y otros grupos parasitarios.

11. BIBLIOGRAFIA

Abdigoudarzi, M.; Esmailnia, K; Shariat, N. Laboratory study on biological control of ticks (Acari:ixodidae) by entomopathogenic indigenous fungi (*Beauveria bassiana*). Iran J Arthropod Borne 2009; 3 (2): 36-43.

Aguilar, T.G; Rodríguez, R.I. Effect of moxidectin against natural infestation of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) in the Mexican tropics. Vet Parasitol 2003; 11 (2): 211–216.

Alonso-Díaz, M.A; Rodríguez-Vivas, R.I; Fragoso-Sánchez, H. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. Arch Med Vet 2006; 38: 105 -113.

Angus, B.M. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. Int J Parasitol 1996; 26 (2): 1341-1355.

Benavides, O.E. Control de las pérdidas ocasionadas por los parásitos del ganado. Carta Fedegan No 69, julio-agosto, (Anexo Coleccionable “Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en explotaciones ganaderas 6”). 2001; 52-63.

Bittencourt, V; Rodriguez, G; Mascarenhas, A; Monteiro, S. Ação dos fungos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 SOBRE larvas do carrapato *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). Parasitol día 1999; 23 (3): 9-13.

Bustillo, A; Cárdenas, R; Posada R. Natural Enemies and Competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia, Neotrop Entomol 2002; 31 (4): 635-638.

Campos, R.A; Arruda, W; Boldo, J.T; Da-Silva, M.V; De-Barros, N.M; De-Azevedo, L; Schrank, A; Vainstein; M.H. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM Analysis and Regulation of Subtilisin-like Proteases and Chitinases. *Curr Microbiol* 2005; 50: 257–261.

Campos, R.A.; Boldo, J.T.; Pimentel, I.C.; Dalfovo, V.; Araújo, W.L.; Azevedo, J.L.; Vainstein and M.H.; Barros, N.M. Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* sp to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Gen Mol Res* 2010; 9 (3): 1421-1430.

Castiglioni, E; Djair, V; Batista, S. Compatibilidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* con nimkol-I® para el combate de *Heterotermes tenuis*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 2003; 69: 38-44.

Castro-Silva, W.; De-Souza, J.; Meneses, D.S.; Heinzen, H.; Cesio, M.V. Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 2009; 64: 267-274.

Cordovés, C.O. Carrapato. Controle ou erradicação. Porto Alegre: Editorial Guaíba Agropecuária, 1997; 197p.

Cova, L.J; Scorza, J.V; García, D.E; Cañizales, L.M; Guedez, C.C; Avendaño, M.L; Medina, M.G. Efecto de *Beauveria Bassiana*, *Beauveria Brongniartii* y la aplicación de Gasoil en el control de moscas caseras en galpones avícolas. *Avances en Investigación Agropecuaria* 2009; 13 (2): 41-53.

De-Castro, J. Sustainable tick. *Vet Parasitol* 2007 71 (2): 77-97.

Delgado, P.A; Murcia-Ordoñez, B. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambi-Agua* 2011; 6 (2): 77-90.

Depieri, R; Martínez, S; Menezes, A. Compatibility of the fungus *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) with extracts of Neem Seeds and leaves and the emulsible oil. *Neotrop Entomol* 2005; 12 (3): 601-609.

Dias Sousa, Lorena Alessandra; Pires Júnior, Hélio Bernardes; Fernandes Soares, Sara; Ferri, Pedro Henrique; Ribas, Patricia; Martins Lima, Eliane; Furlong, John Pinheiro Bittencourt, Vânia Rita Elias; De Souza Perinotto, Wendell Marcelo; Ferreira Borges, Lígia Miranda. Potential synergistic effect of *Melia azedarach* fruit extract and *Beauveria bassiana* in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in cattle infestations. *Vet Parasitol* 2011; 175: 320 -324.

Drummond, R.O; Whetstone, T.M. Oviposition of the gulf coast tick. *J Econ Entomol* 1969; 63: 1547-1551.

Estrada-Peña, A; Bouattour, J; Camicas, A; Guglielmone, H.F; Jongejan, A; Latif, R; Walker, A.R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Exp Appl Acarol* 2006; 38: 219–235.

FAO Animal Production And Health. Ticks and tick-borne diseases. [en línea]. 2007. URL Disponible en: <http://www.fao.org/DOCREP/004/X6538E/X6538E00.HTM> . [Fecha de acceso 15 de enero de 2013].

Fernandes, E; Bittencourt, V. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Exp Appl Acarol* 2008; 46: 71-93.

Fernandes, Éverton K.K; Angelo, Isabele C; Rangel, Drauzio E.N; Bahiense, Thiago C; Moraes, Áurea M.L; Roberts, Donald W; Bittencourt, Vânia R.E.P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. *Vet Parasitol* 2011. 182: 307-318.

Fernandes, E; Bittencourt, E; Roberts, D. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Exp Parasitol* 2012; 130: 300-305.

Fernández, M.; Berlanga, A.; Cruz, C; Hernández, V. Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la inhibición de oviposición, eclosión y potencial reproductivo en una cepa triple resistente de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). *Entomotropica* 2010; 25 (3): 109-115.

Gindin, G.M; Samish, M; Alekseev, E; Glazer, I. The susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) ticks to entomopathogenic fungi. *Bio Sci Technol* 2001; 11: 111–118.

Graf, J.F; Gogolewsk, N; Leach-Bing, G.A; Sabatini, M.B; Molento, E.L; George, J.E. Cattle fever tick eradication programme in the USA: history, achievements, problems and implications for other countries. The eradication of ticks”, *Proceedings of the expert consultation on the eradication of ticks with special reference to Latin America*, 1987; 1–7.

Graf, J.F; Gogolewsk, N; Leach-Bing, G.A; Sabatini, M.B; Molento, E.L; Arantes, G.J. Tick control: an industry point of view. *Parasitol* 2004; 129: 427–442.

Guglielmone, AA; Estrada–Peña, A; Keirans, JE; Robbins, RG. Ticks (Acari: Ixodidae) of the Neotropical Zoogeographic Region. The Netherlands: International

Consortium on Ticks and Tick – borne Diseases (ICTTD – 2), 2003; 173 p.

Guglielmone, AA; Bechara, GH; Szabó, MP; Barros, DM; Faccini, JI; Labruna, MB; De La Vega, R; Arzua, M; Campos, M; Furlong, J; Mangold, AJ; Martins, J; Rodríguez, M; Venza, JM; Estrada-Peña, A. Garrapatas de importancia médica y veterinaria: América Latina y el Caribe. The Netherlands: International Consortium on Ticks and Tick–borne Diseases (ICTTD – 2), 2004; 173 p.

Guglielmone, H.F; Szabó, M.P; Martins, J.R; Estrada-Peña, A.A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Editorial Butantan, 2006; 223p.

Hernández, F. Manual de ganadería doble propósito. El manejo integrado en el control de garrapatas. Maracaibo (Venezuela): Editorial Universidad del Zulia, 2005; 384-391.

Hoogstraal, H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Adv Parasitol* 2009; 24:135-238.

Jongejan, F; Uilenberg, G. The global importance of ticks. *Vet Parasitol* 2004; 129 (1): 43-54.

Kaaya, G; Hedimbi, M. The use of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, as bio-pesticides for tick control. *Int J Agric Sci* 2012; 2 (6): 245-250.

Kay, B.H; Kemp, H. Vaccines against arthropods. *Am J Trop Med* 1994; 50: 87-96.

Kocan, KM; De la Fuente, J; Blouin, E; Coetzee, J; Ewing, S. The Natural History

of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol* 2010; 167 (2-4): 95-107.

Kunz, S.E; Kemp, D.H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impacts. *Rev Sci Tech Int Epiz* 1994; 13: 1249–1286.

Leemon, D.M; Turner, L.B; Jonsson, N. Pen studies on the control of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Vet Parasitol* 2008; 156: 248–260.

Li, Z.Z; Li, C.R; Huang, B; Fan, M.Z. *Cordyceps bassiana*. *Chinese Sci. Bull* 2001; 9: 751-756.

Luz, C; Silva, I; Magalhães, B; Cordeiro, C; Tigano, M. Control Of *Triatoma Infestans* (Klug) (Reduviidae: Triatominae) with *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill. *An Soc Entomol* 1999; 28 (1): 101-104.

Mendes, M.C; Lima, C.K; Nogueira, A.H; Yoshihara, E; Chiebao, D.P. Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo. *Vet Parasitol* 2011; 178 (3): 383-388.

Ming, Sun; Qiaoyun, Ren; Guiquan, Guan; Zhijie, Liu; Miling, Ma; Huitian, Gou; Ze, Chen; Youquan, Li; Aihong, Liu; Qingli, Niu; Jifei, Yang; Hong, Yin; Jianxun, Luo. Virulence of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* to the engorged female *Hyalomma anatolicum anatolicum* tick (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 2011. 180: 389-392.

Ming, Sun; Qiaoyun, Ren; Guiquan, Guan; Yufeng, Li; Xueqing, Han; Chao, Ma; Hong, Yin; Jianxun, Luo. Effectiveness of *Beauveria bassiana* sensu lato strains for

biological control against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in China. *Parasitol Int* 2013; 62: 412-415.

Murrell, A; Barker, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Kock 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst Parasitol* 2003; 56:169-172.

Ojeda-Chi, M.M; Rodríguez-Vivas, R.I; Galindo-Velasco, E; Lezama-Gutiérrez, R. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Vet Parasitol* 2010; 170: 348-354.

Ojeda-Chi, M.M; Rodríguez-Vivas, R.I; Galindo-Velasco, E; Lezama-Gutiérrez, R; Cruz-Vázquez, C. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Rev Mex Cie Pecu* 2011; 2 (2): 177-192.

Okamoto, K; Amarasekare, P. The biological control of disease vectors. *J Theo Biol* 2012; 309: 47–57.

Onofrio, V.C; Labruna, M.B; Pinter, A; Giacomin, F.G; Barros-Battesti, D.M. Comentários e chaves para as espécies do gênero *Amblyomma*. *Scientiae* 2006; 21 (1): 14-19.

Orozco, M; Álvarez, V; Jiménez, A; Acuña, O. Evaluación *in vitro* de hongos nematofagos para el control biológico de nematodos gastrointestinales de rumiantes. *Rev MVZ Córdoba* 2009; 14 (3): 1820-1830.

Paião, J.C; Monteiro, A.C; Kronka, S.N. Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. *World J Microb Biot* 2001; 17: 245-251.

Patarroyo, J.H; Vargas, M.I; Gonzales, C.Z; Guzmán, F; Martins-Filho, O.A; Afonso, L.C; Valente, F.L; Peconick, A.P; Marciano, A.P; Patarroyo, V.A; Sossai, S. Immune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm7462® against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Vet Parasitol 2009; 166: 333–339.

Polar, R; Aquino, M; Kairo, T.K; Moore, D; Pegram, R; John, S; Roach-Benn, C, Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. Vet Parasitol 2005; 134: 159–167.

Perinotto, W.M.S; Angelo, I.C; Golo, P.S; Quinelato, S; Camargo, M.G; Sá, F.A; Bittencourt, V.R.E.P. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. Exp Parasitol 2012. 130: 257-260.

Qiaoyun, Ren; Zhijie, Liu; Guiquan, Guan; Ming, Sun; Miling, Ma; Qingli, Niu; Youquan, Li; Aihong, Liu; Junlong, Liu; Jifei, Yang; Hong, Yin; Jianxun, Luo. Laboratory evaluation of virulence of Chinese *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to engorged female *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. Biol Control 2012; 63: 98-101.

Rodríguez-Vivas, R.I; Quiñones, A.F; Fragoso, S.H. Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. Enfermedades de importancia económica en producción animal. México DF: Editorial McGraw-Hill-UADY, 2005; 571-592.

Rodríguez-Vivas, R.I; Rodríguez-Arévalo, F; Alonso-Díaz, M.A; Fragoso- Sánchez, H; Santamaria, V.M; Rosario-Cruz, R. Prevalence and potential risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms in the State of Yucatan, Mexico. Prev Vet Med 2006; 75: 280–286.

Rodríguez-Vivas, R.I; Hodgkinson, J.E; Trees; A.J. Acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Current status and mechanisms of resistance. Rev Mex Cienc Pecu 2012; 3 (1): 9-24.

Rosado-Aguilar, J.A; Aguilar-Caballero, A; Rodríguez-Vivas, R.I; Borges-Argaez, R; Garcia-Vázquez, Z; Méndez-González, M. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). Vet Parasitol 2010; 168: 299–303.

Rosario, C.R; Hernández, O.R. Evolución química de la resistencia a acaricidas. Memorias del Curso-Taller, diagnóstico de resistencia a ixodidas en garrapatas *Boophilus microplus*. Jiutepec, Morelos, México. 2001; 23-30.

Sagüés, M.F; Purslow, P; Fernández, S; Fusé, L; Iglesias, L; Saumella C. Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos gastrointestinales en el ganado y sus formas de administración. Rev Iberoam Micol 2011; 28 (4): 143–147.

Saldarriaga, Y; Vásquez, Calle, J. Virulencia de *Beauveria bassiana* y Triflumuron sobre *Rhodnius prolixus* y *R. pallescens* (Hemíptera: Reduviidae). Rev Colomb Entomol 2005; 31 (2) 177-182.

Sônia, M.F; Broglio-Micheletti, L.A; De-Souza, E.N; Valente, M; De-Araújo, J.C; Da-Silva, N; Gómez-Torres; M.L. Evaluation of entomopathogenic fungi as biological control agents *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). IDESIA 2012; 30 (1): 93-99.

Souza, E.J; Reis, R.C; Bittencourt, V.R. Evaluation of *in vitro* of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on eggs and larvae of *Amblyomma cajennense*. Rev Bras Parasitol vet 1999; 8 (2): 127-131.

Stafford, K; Allan, S. Field applications of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for the control of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 2010; 47 (6): 1107-1115.

Sun, M; Guan, G.Q; Ren, Q.Y; Yin, H; Luo, J.X. Prospect for biological control of ticks (in Chinese). Acta Parasitol Med Entomol Sinica 2010; 17: 249-253.

Vargas, M.S; Céspedes, N.S; Sánchez, H.F; Martins, J.R; Céspedes, C.O. Avaliação in vitro de uma cepa de campo de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistente à amitraz. Cienc Rural 2003; 33: 737–742.

Vasconcelos, V.O; Furlong, J; Freitas, G.M; Dolinski, C; Aguilera, M.M; Rodríguez, R.D; Prata, M. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitol Res 2004; 94: 201–206.

Yao, J; Huang, D.Q. The study on the correlation between protease, chitinase and β -N-GlcNAcase production and the virulence of *Beauveria bassiana* to *Dendrolimus punctatus* (in Chinese). J Suzhu Col 2004; 19(4): 102-106.