

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



Adaptación de *Metarhizium* sp. Como Entomopatógeno de garrapatas.

POR

HÉCTOR ZÁRATE PAREDES

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA

OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA

JUNIO DE 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Adaptación de *Metarhizium* sp. Como Entomopatógeno de garrapatas.

POR
HÉCTOR ZÁRATE PAREDES

TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

PRESIDENTE:

M.C. JOSE LUIS COVARRUBIAS CASTRO

VOCAL:

MVZ. JESÚS ALFONSO AMAYA GONZÁLEZ

VOCAL:

MVZ. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO

VOCAL SUPLENTE:

MVZ. MARIA GUADALUPE SÁNCHEZ LOERA


MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



División de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA

JUNIO DE 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Adaptación de *Metarhizium* sp. Como Entomopatógeno de garrapatas.

POR
HÉCTOR ZÁRATE PAREDES

TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

ASESOR PRINCIPAL:

M.C. JOSE LUIS COVARRUBIAS CASTRO

ASESOR EXTERNO:

DR. JOSÉ ALFREDO SAMANIEGO GAXIOLA

MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA

JUNIO DE 2016

AGRADECIMIENTOS

Ante el gran numero de personas con las que me he relacionado de diferente manera en mi camino universitario, me han brindado una esencial contribución a realizar este trabajo de investigación, algunos tal vez no lo recuerden o incluso no han sido muy conscientes de su aporte, pero yo les guardo un grato recuerdo y agradecimiento muy particular a cada uno de ellos.

A mi asesor, el MC. José Luis Covarrubias Castro, por haber aceptado, orientado, por compartir con mis compañeros y yo parte de sus conocimientos, no tengo palabras para agradecerle el tiempo dedicado... GRACIAS MÉDICO.

A mi asesor externo, el Dr. José Alfredo Samaniego Gaxiola, por compartir su conocimientos y por ende su experiencia tan grande, así mismo agradezco porque haya aceptado realizar el proyecto de investigación en los laboratorios del INIFAP de Matamoros Coahuila.

A mi **Alma Terra Mater**, por haberme brindado la formación Académica Superior necesaria para mi vida profesional.

A los maestros que me brindaron confianza, apoyo y consejos durante mi estancia en la gloriosa Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna.

A mi amigo, José Antonio VicenteGarcía, por ser casi un hermano, por compartir noches en vela de estudio, tristezas y alegrías, por compartir conmigo parte de sus conocimientos, gracias amigo por ser parte de mi vida y por dejarme ser un pedacito de la tuya.

DEDICATORIA

Se la dedico al creador de mi vida, al forjador de mi camino, a mi padre celestial, el que me acompaña y siempre me levanta de mis continuos tropiezos, al creador de mis padres y de las personas que mas amo, con mis mas sincero amor.

Con mucho amor a **mis padres, Maurilio Zárate Ipatzi y Teresa Paredes Ahuatzi**, por haberme traído al mundo, por estar conmigo en todo momento, por brindarme confianza, por las palabras de aliento, así como sus regaños y consejos que aun en la distancia me dieron la fuerza de voluntad, coraje para terminar mi carrera y todos sus esfuerzos que fueron impresionantes.

A mis hermanas y hermanos por motivarme en seguir preparandome profesionalmente, agradeciendo su aporte emocional, brindandome el apoyo, confianza y aliento para culminar mis estudios universitarios.

Posiblemente en este momento no entiendes mis palabras, pero para cuando seas capaz, quiero que te des cuenta de lo que significas para mi. Eres la razon de que me levante cada dia esforzandome por el presente, eres mi principal motivacion, te agradezco por llegar a mi vida.

“Quiero compartir con ustedes el secreto que me ha llevado a alcanzar todas mis metas: mi fuerza reside únicamente en mi tenacidad”

Louis Pasteur

RESUMEN

Un asilado de *Metarhizium* sp. fue segregado mediante dilución de 10^{-4} en medio de cultivo PDA. Los aislados segregados (19) fueron inoculados en garrapatas vivas e incubados hasta 14 días a 27°C ; en éste caso, y subsecuentes inoculaciones del hongo sobre las garrapatas, se determinaron: vivas, mortandad, micelio de *Metarhizium* sp., y esporulación sobre la garrapata y patogenicidad; ésta última conformada por la suma de micelio y esporulación del hongo. Posteriormente, de los mejores aislados que invadieron a las garrapatas, se sembraron en los medios de cultivo PDA y Sabourand; de ambos medios, se tomaron esporas para una segunda inoculación sobre las garrapatas, evaluando los parámetros señalados. De la segunda colonización de las garrapatas, las mejor colonizadas, se sembraron en PDA y de aquí, una tercera inoculación sobre las garrapatas.

La prueba Ji-cuadrada, aplicada para determinar la dependencia de las variables garrapatas vivas, muertas, micelio y esporulación en todos los casos indicó no interdependencia entre las variables ($P < 0.01$). Lo que sugiere que algunas garrapatas pudiesen morir por *Metarhizium* sp., antes de que el micelio y/o esporas se presenten; así como la capacidad de las garrapatas para sobrevivir temporalmente aún después de mostrar micelio y/o esporas sobre sus cuerpos.

La patogenicidad de las 19 segregaciones tuvo una media de 3.3 (de un máximo de 5.0), una desviación estándar (σ) 1.15 y con un intervalo de confianza del 99 % arrojó un valor de 0.39. En la segunda inoculación de las garrapatas, utilizando el hongo que provino de PDA (9 aislados) y Sabourand (8 aislados) la media de patogenicidad fueron de 4.7 y 5.0, respectivamente; en la tercera inoculación (5 aislados PDA) la media de patogenicidad fue de 4.5. Las medias de patogenicidad de los aislados provenientes de la primera, segunda (PDA y Sabourand) y tercera inoculación fueron distintas, aplicando la prueba de intervalo de confianza con $P = 0.01$.

Una esporulación homogénea se obtuvo de los aislados cuyo origen fue las garrapatas inoculadas y colonizadas por tercera vez; asimismo, la patogenicidad en éste caso alcanzó en promedio 4.5 de un máximo de 5; por todo ello, tanto la esporulación como la patogenicidad de *Metarhizium* sp. mejoró durante el proceso

de segregación, selección e inoculaciones reiteradas del hongo sobre las garrapatas.

Palabras claves. Control biológico, *Rhipicephalus sanguineus*, *Metarhizium sp.*, patogenicidad, entomopatógenos.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos.....	iii
----------------------	-----

Dedicatoria	iv
Resumen	v
1. Introducción	1
2. Justificación	4
3. Objetivos general	5
4. Objetivo específico.	5
5. Revisión de literatura	5
5.1. Etapa de vida libre de la garrapata.	7
5.2. Etapa de vida parasitaria de la garrapata.	8
5.3. Importancia económica de las garrapatas.	10
5.4. Control químico.	11
5.5. Control inmunológico, biológico.	12
5.6.1. Generalidades de los hongos entomopatógenos	13
5.6.2. <i>Metarhizium anisopliae</i> como agente control	14
5.6.3. Proceso infectivo de los hongos entomopatógenos en los ácaros	15
5.6.4. Adherencia de la conidia a la cutícula del ácaro	15
5.6.5. Germinación de los conidios	16
5.6.6. Penetración al tegumento del hospedero	16
5.6.7. Crecimiento del hongo en el hemocele	17
5.6.8. Producción de micotoxinas.	17
5.6.9. Muerte del acaro	18
6. Materiales y Métodos	18
6.1. Segregación de <i>Metarhizium</i> sp.	19
6.2. Selección, aislamientos, segregados	20
6.3. Esporulación del hongo en medio de cultivo	20
7. Análisis estadístico	21
8. Resultados	22
9. Discusión	27
10. Conclusiones	29
11. Literatura citada	30
12. Anexos	38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Comportamiento de garrapatas al inocularse con las 19 segregaciones de <i>Metarhizium</i> sp.	24
---	----

Cuadro 2.- Comportamiento de las garrapatas al re-inocularse (2º) con <i>Metarhizium</i> sp., el medio de cultivo de donde provinieron los asilados fue el Sabourand.....	25
Cuadro 3.- Comportamiento de las garrapatas al re-inocularse (2º) con <i>Metarhizium</i> sp., el medio de cultivo de donde provinieron los asilados fue el PDA	25
Cuadro 4.- Comportamiento de las garrapatas al re-inocularse (3º) con <i>Metarhizium</i> sp., el medio de cultivo de donde provinieron los asilados fue el PDA	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Características morfológicas de los ixodidos	7
Figura 2.- Vista ventral de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> A; Hembra y B; Macho.....	9
Figura 3.- Vista dorsal de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> A; Hembra y B; Macho.....	9
Figura 4.- Mecanismos de acción del hospedador	10
Figura 5.- Proceso infectivo de los hongos entomopatógenos	15
Figura 6.- Garrapata muerta no invadida, invadidas por <i>Metarhizium</i> sp. no invadida y aún viva.....	23
Figura 7.- Esporulación de los aislados de <i>Metarhizium</i> sp.	27

1. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son ectoparásitos obligados, que se alimenta de sangre de los vertebrados terrestres, incluyendo reptiles, aves, perros y humanos (Domínguez, 2011), lo que ocurre, al ser atraídas por el CO₂ y el calor corporal que emanan (Castillo-Martínez *et al.* 2015). Estos parásitos, son consideradas a nivel mundial después de los mosquitos como los segundos vectores transmisores de patógenos, (Rubio *et al.* 2015), también constituyen una clara y continua amenaza para la salud humana y animal a través de provocar morbilidad al ganado y fauna silvestre, pérdida de peso, exsanguinación y parálisis flácida ascendentes en sus hospedadores por la inoculación de neurotoxinas presentes en sus glándulas salivales (García *et al.* 2007; Jaworski *et al.* 2010).

Se clasifican en clase de los arácnidos, en la subclase Acari, orden Parasitiformes, suborden Ixodida (Estrada-Peña *et al.* 2012). Poseen cuatro pares de patas y un cuerpo globoso, aplanado dorso-ventralmente y no segmentado que las diferencia de otros arácnidos, cuyo cuerpo está dividido en dos partes el cefalotórax y el abdomen (Manzano-Román *et al.* 2012). Son relativamente grandes y de estadios longevos, de alimentación periódica, teniendo grandes ingestas de sangre (Rodríguez-Vivas *et al.* 2012).

Se encuentran distribuidas en diferentes zonas de todo el mundo pero es principalmente en Centro y Sur América y el Occidente de África y prevalecen en regiones tropicales y subtropicales (Rubio *et al.* 2015; Martínez-tinajero *et al.* 2016), donde generan las más grandes pérdidas económicas, causando la disminución de producción de leche y carne, mortalidad del ganado y el costo elevado de su control (López *et al.* 2009). Su distribución en México está relacionado a factores

ambientales como temperatura, humedad relativa, y la cobertura de la vegetación, presencia y abundancia de hospederos (Cantú y García, 2013).

En México se han registrado 100 especies de garrapatas que corresponden a un 11.3% de la diversidad mundial conocida (Pérez *et al.* 2014), tanto en animales silvestres como domésticos distribuyéndose en regiones tropicales y subtropicales (53%), regiones templadas (27%) (Rodríguez-Vivaset *et al.* 2014). Las garrapatas son vectores importantes para una amplia gama de patógenos (Cafarchia *et al.* 2015), como *Babesia spp.*, *Theileria spp.*, bacterias; *Rickettsias spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.*, virus; *Nairovirus*, *Flavivirus*, *Asfavirus* (Ramírez-Barrios *et al.* 2008; Alekseev, 2010; Rosario *et al.* 2010; Domínguez, 2011; Rubio *et al.* 2015), malaria o paludismo (Qviller *et al.* 2014).

Estas enfermedades suelen ser el resultado de patrones de transmisión compleja, la presencia y abundancia de importante reservorio anfitriones y quizás la más importante, la dinámica y el comportamiento de los seres humanos en las proximidades de los focos de garrapatas (Estrada-Peña, 2006) y como parásitos, las garrapatas poseen potencial para provocar toxicosis, parálisis, irritación y alergia a sus hospedadores (Debárbora *et al.* 2011). La necesidad de la investigación en modelos nuevos para la eliminación del acaro surge de los problemas asociados con la resistencia que han adoptado al uso de acaricidas en Australia, y sus esfuerzos fueron aplicados para modelar algunos patrones de actividad estacional de *Ixodes ricinus* en Europa (Estrada-Peña, 2006).

El control de las garrapatas es más difícil debido a la presencia de poblaciones resistentes a todas las principales familias de acaricidas (Fernández-Salas *et al.* 2011). Se ha informado de las poblaciones de *R. microplus* resistentes

a ivermectina en Brasil y México, también hay informes de poblaciones con diversas formas de resistencia a varias moléculas químicas, existe información sobre garrapatas resistentes a organoclorados y organofosforados (Fernández-Salas *et al.* 2011).

Los hongos entomopatógenos se han constituido en grandes biocontroladores de insectos, ácaros, plaga de cultivo y animales. Utilizando esta alternativa con el control biológico haciendo biopreparados a partir de hongos que son aplicados por medio del baño en animales de compañía y al ganado que está en pastoreo y estabulado (Beltrán *et al.* 2008; Valverde-Sánchez *et al.* 2015).

Se han descrito más de 750 especies de hongos entomopatógenos y el aislamiento de nuevas cepas continúa. Dentro de los más utilizados a nivel mundial se encuentran *Metarhiziumanisopliae* Metsch (33.9%), *Beauveria bassiana* (33.9%), *Isaria fumosorosea* (antes *Paecilomyces fumosoroseus*) (5.8%) y *Beauveria brongniartii* (4.1%) (Téllez-Jurado *et al.* 2009).

El control biológico es una práctica en constante crecimiento que busca la destrucción total o parcial de patógenos, frecuentemente mediante el uso de sus enemigos naturales, existen numerosos reportes sobre la utilización de microorganismos entomopatógenos que por su capacidad de producir enfermedad y/o muerte en ácaros, insectos y arácnido, son utilizados como agentes de control biológico (Téllez-Jurado *et al.* 2009).

Los hongos tiene mecanismos de invasión únicos que les permiten atravesar de forma directa la cutícula o la pared del tracto digestivo (Téllez-Jurado *et al.* 2009) lo que los hace excelentes agentes de control biológico actuando como acaricidas de contacto (Charnley y Collins, 2007; Alekseev, 2010).

Los hongos son adecuados para el desarrollo como bioplaguicidas, ya que es posible implementar su producción en masa en vitro y para almacenar sus esporas durante mucho tiempo; por otra parte, sus esporas pueden ser asperjadas con equipos convencionales (Alekseev, 2010).

Así, la búsqueda de cepas de hongos que matan las garrapatas bajo condiciones naturales, parece no sólo relevante sino también prometedora (Arguedas *et al.* 2008; Alekseev, 2010).

2. JUSTIFICACIÓN

Se ha establecido que las garrapatas tienen una gran atención científica sobre todo por su papel como vectores de numerosos agentes patógenos en la Comarca Lagunera. La mayoría de las investigaciones en el mundo se centran principalmente en temas microbiológicos seguido de los clínicos relacionados con estos patógenos y los métodos químicos para el control de poblaciones de garrapatas. El desarrollo de hongos entomopatógenos para el control de plagas tiene un progreso en los últimos años, el empleo de estos agentes de control biológico presenta ventajas, como son; seguridad para la salud humana y fauna, reducción de residuos de insecticidas en los alimentos, lagos y manantiales causando impacto negativo en las especies acuáticas. En esta investigación el desarrollo de la tecnología para la producción de estos hongos entomopatógenos se realiza con la finalidad de utilizar alternativas al uso exclusivo de insecticidas químicos.

Sin embargo, para alcanzar un posible control de las garrapatas habrá que evaluar y adaptar aislamientos de hongos nativos de La Laguna como entomopatógenos, por ello, el propósito de este trabajo.

3. OBJETIVO GENERAL.

Determinar si al segregar distintos aislados de *Metarhizium* sp. por medio de inoculaciones reiteradas sobre *Rhipicephalus sanguineus* la patogenicidad del hongo se incrementa sobre el ácaro.

4. OBJETIVO ESPECIFICO

Valorar la patogenicidad inicial de distintos aislados segregados de *Metarhizium* sp. sobre *R. sanguineus*.

Una vez, seleccionado los mejores aislados (segregaciones), determinar si subsecuentes re-inoculaciones incrementan la patogenicidad de *Metarhizium* sp. sobre *R. sanguineus*.

Determinar sí es posible hacer consistente la producción de esporas *Metarhizium* sp. en alguno de los medios de cultivo PDA o Sabourand, después de segregar al hongo y subsecuentemente re-inoculaciones.

5. REVISIÓN DE LITERATURA

La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* de origen africano y a partir de 1844 se inician registros de las especies de garrapatas que forman su gran diversidad (Pérez *et al.* 2014), es la especie de garrapata más cosmopolita en caninos resultado de su dispersión por las migraciones humanas que han

transportado al hospedador principal (Cortés, 2010; Debárbora *et al.* 2011), es también conocida como la garrapata marrón del perro ya que es el más común ectoparásito y ocasionalmente parasita a otro huésped incluyendo al humano (Rubio *et al.* 2015). Y cuyo entorno urbano, suburbano y rural, están bien adaptadas (Debárbora *et al.* 2011). Las garrapatas son consideradas a nivel mundial después de los mosquitos como los segundos vectores transmisores de patógenos (Arrieta *et al.* 2013; Rubio *et al.* 2015). En América se encuentra desde Canadá hasta Argentina, entre los 50° Norte y 35° Sur, en México está presente en diversas regiones, en altitudes que van desde el nivel de mar hasta los 1500 msnm (Morales-Soto y Cruz-Vázquez. 1998; Ramírez-Barrios *et al.* 2008). Las garrapatas tienen cabeza y tórax fusionados, cuatro pares de patas en adultos y tres pares en larvas, todas compuestas por coxa, trocánter, fémur, tibia, protarso y tarso que terminan en dos uñas y una pieza intermedia que actúa como órgano de adherencia (Faccioli, 2011), los estadios ontológicos advierten huevo, larva, ninfa y adulto, en la cual la base del gnatosoma está compuesta por el hipostoma (fijarse) y los palpos (órganos táctiles), presenta forma hexagonal con ángulos agudos en las hembras, tonalidades de color café oscuro en el escudo y café claro en el resto del cuerpo, ojos ligeramente convexos, coxa I bifurcada con espolón, 11 festones visibles en machos, abertura genital y anal en forma de herradura (U) en la parte posterior (♀), área espiracular con sedas escasas, placas accesorias alargadas (♂) y placas adanales trapezoidales (♂) (Castillo-Martínez *et al.* 2015). La cara dorsal de *R. sanguineus* en el escudo que es una capa de quitina, lisa o con dibujos, se encuentran surcos más o menos marcados, que delimitan celdas o festones marginales (Faccioli, 2011). En la secreción oral se han identificado componentes

como: aminas vasoactivas (histamina y análogos), anestésicos, anticoagulantes, hemolisinas, hemoaglutininas, toxinas, enzimas: descarboxilasas compuesto que puede actuar sobre péptidos del huésped y generar aminas vasoactivas; hialuronidasa que opera como un agente de difusión por medio de la degradación del ácido hialurónico de la matriz intercelular, compuestos necrotizantes, prostaglandinas y materiales de peso molecular bajo (Bautista, 1987).

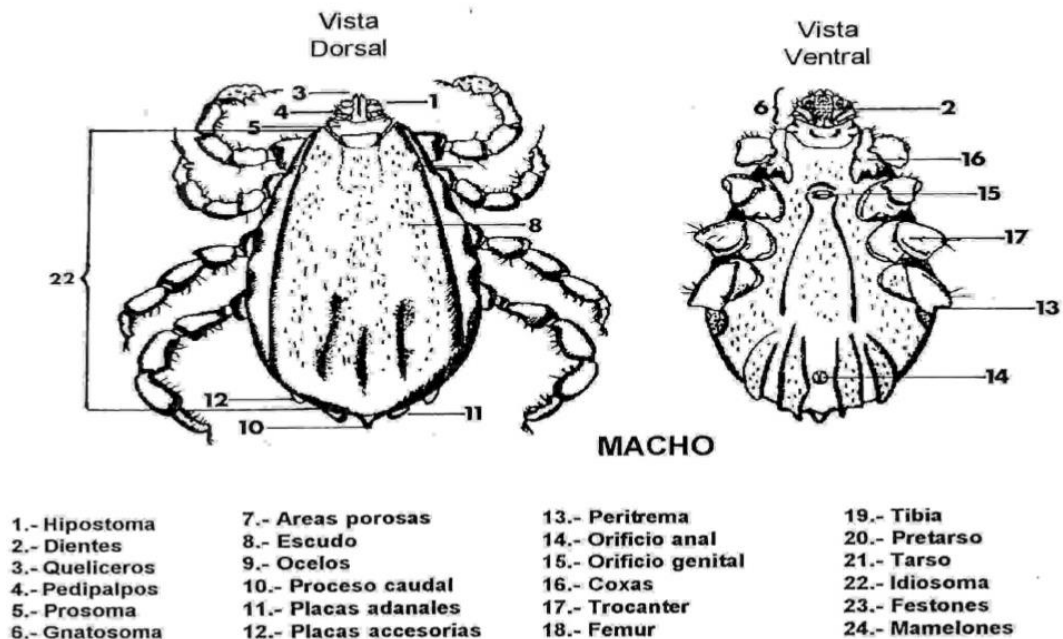


Figura 1. Características morfológicas de los ixodidos, figura tomada de bautista, 1987.

5.1. ETAPA DE VIDA LIBRE DE LA GARRAPATA

Las garrapatas pueden vivir entre dos y seis años, pasando entre el 95% y 98% de sus vidas fuera de su huésped (Álvarez-Hernández *et al.* 2015), desarrollando la fase no parasitaria de su ciclo en viviendas y edificios habitados por perros se le considera una especie intradomiciliaria (Ramírez-Barrios *et al.* 2008), lo que minimiza la influencia de las condiciones ambientales externas sobre

el desarrollo de cada estadio (Debárbora *et al.* 2011). Esta especie se considera Ixódido y posee una gran capacidad de desplazamiento, lo que es indicativo de la diversidad y abundancia de microhábitats donde se puede albergar con frecuencia, penetrando en pequeños huecos, grietas y capas de pintura deteriorada en paredes y superficies de cemento (García *et al.* 2007). Las garrapatas hembras ponen los huevecillos en áreas de vegetación abundante y alta, la eclosión del huevo depende de las condiciones medioambientales, después se libera una larva con tres pares de patas y esta se mueve en busca de su hospedador. La vista ventral y dorsal de macho y hembra de *Rhipicephalus sanguineus* se esquematizan en las figuras 2 y 3, respectivamente.

5.2. ETAPA DE VIDA PARASITARIA

Las garrapatas no saltan, ni vuelan, ni se dejan caer de los árboles, ellas trepan sobre los animales desde sus patas hasta las orejas, cuello y zona perianal, lugares donde la piel es más delgada lo que facilita su alimentación e impide que su hospedante se deshagan de estos parásitos (Manzano-Román *et al.* 2012). Tras subir al hospedante y localizar el lugar adecuado para fijarse, perforan la piel con el extremo distal, dentado, de sus quelíceros a la vez que introduce el hipostoma en la misma, sirviendo como primer anclaje, durante el proceso los pedipalpos que son órganos sensoriales, se retiran hacia los lados quedando fuera de la piel. Estos ácaros, segregan un cono de cemento alrededor de las piezas bucales obteniendo así su anclaje definitivo, el cemento es rico en proteínas, lípidos, lipoproteínas, y carbohidratos, que provocan dermatosis (Manzano-Román *et al.* 2012). Los quelíceros y el hipostoma desgarran los vasos capilares provocan una hemorragia, la garrapata inyecta saliva, cuyas moléculas líticas cooperan con la respuesta inflamatoria e inmunitaria del hospedador para formar un pequeño absceso o cavidad en el cual succionan la sangre y los exudados tisulares (Manzano-Román

et al. 2012). La ingestión de sangre es un proceso lento que lleva entre dos y seis horas (Álvarez-Hernández *et al.* 2015).

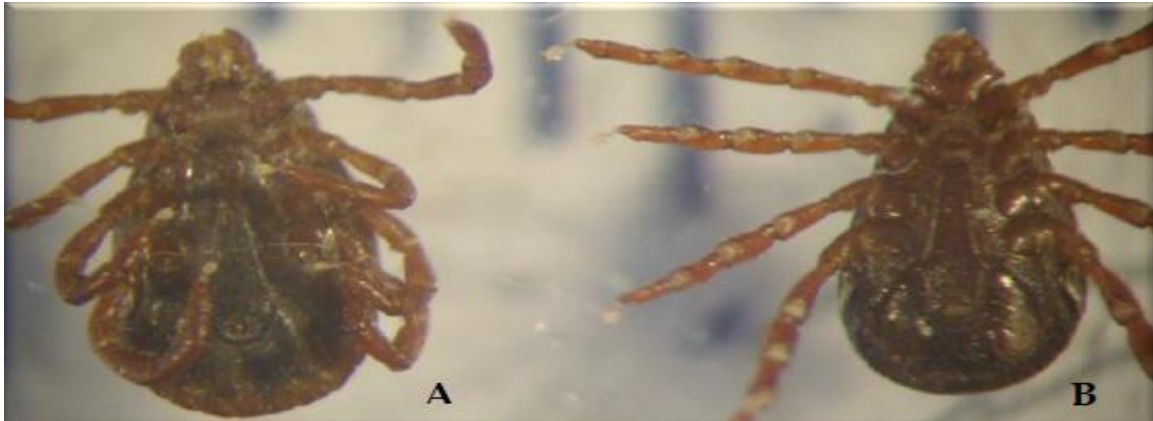


Figura 2. Vista ventral de *Rhipicephalus sanguineus* A; Hembra y B; Macho, foto tomada por Faccioli, 2011.



Figura 3. Vista dorsal de *Rhipicephalus sanguineus* A; Hembra y B; Macho, foto tomada por Faccioli, 2011.

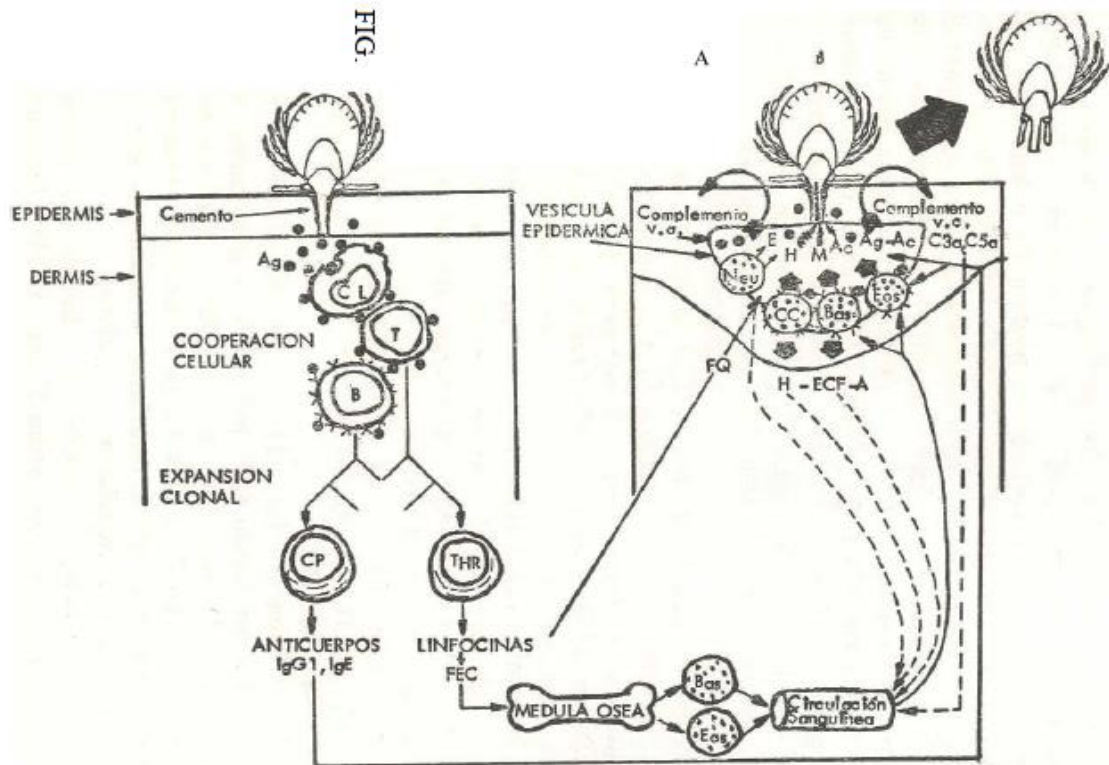


Figura 4. Mecanismos de acción del hospedador, foto tomada de Bautista, 1987.

5.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LAS GARRAPATAS

Entre los efectos más importantes que producen las garrapatas a los animales domésticos y silvestres, se encuentra la disminución en el consumo de alimento, pérdida de peso, anemias producidas por pérdida de sangre, irritación por picaduras, depreciación de las pieles afectadas por picadura, un alto costo asociado al control, y tratamiento de las enfermedades que transmiten (Rodríguez-Alcocer *et al.* 2014), pueden transmitir diversos agentes patógenos como virus, bacterias, rickettsias y protozoos. Esto puede conducir a enfermedades agudas, crónicas o incluso, a la muerte de los animales, además reporta alteraciones en varios metabolitos entre los que se encontraban la hemoglobina, glóbulos blancos,

colesterol, albúmina, globulina, amilasa, fosfatasa alcalina y también es posible que secreten compuestos hepatotóxicos (Ojeda-Chi *et al.* 2011).

5.4. CONTROL QUÍMICO

Los problemas relacionados a las garrapatas han creado una creciente demanda de métodos de control y combate de las infestaciones, en México y en otras partes del mundo se ha realizado estrategias mediante el uso diferentes familias químicas, pero han sido parcialmente exitosas ya que los costos elevados de los tratamientos, precio de mano de obra y los serios problemas con la contaminación de productos y subproductos debido a su toxicidad causando efectos adversos sobre la salud humana (Miller *et al.* 2006; González-Sáenz, 2009; Rosario *et al.* 2010) y animal, así como, para el medio ambiente representa un problema de contaminación química del aire, suelo, agua, flora y fauna silvestre; ya que no solo se trata de eliminar la garrapata del animal si no del medio que rodea a estos (Argueta, 2011).

Los acaricidas más empleados en México son: organofosforados (OF), piretroides sintéticos (PS) y amitraz (Am) (Alonso-Díaz *et al.* 2006). Las lactonas macrocíclicas (LM) son endectocidas que también controlan las infestaciones por garrapatas y han sido usadas en los últimos años en México (Rodríguez-Vivas *et al.* 2014).

5.5. CONTROL INMUNOLÓGICO, BIOLÓGICO

Se han evaluado y desarrollado alternativas de control incluyendo prácticas de manejo de los animales, selección de razas de bovinos resistentes a las

garrapatas, uso de extractos de plantas, manejo de pastizales, vacunación (anti garrapatas), y control biológico (hongos entomopatógenos). (Rodríguez-Vivas *et al.* 2014). Otra es a través de inmunogenos recombinantes notificados por primera vez en Australia aislados del intestino de la garrapata y recombinados con *Escherichia coli* y posteriormente en Cuba emplearon la misma tecnología pero con una levadura (*Pichia pastoris*) y se desarrolló el inmunogeno Herber Biogar (Botello *et al.* 2011).

En México existen varios métodos no químicos que se han empleado con éxito para el control de garrapatas (el uso de razas bovinas resistentes a garrapatas, rotación y descanso de praderas, control biológico y vacunas). Sin embargo, el método más promisorio para reducir las poblaciones de garrapatas, es el uso de hongos entomopatógenos, este control consiste en aplicar sistemáticamente hongos entomopatógenos como es *Metarhizium anisopliae*, que no afecten a la especie hospedadora, disminuyendo así el número de aplicaciones de productos químicos y reduciendo los riesgos sobre la salud humana, animal y ambiental (Bram, 1994; Willadsen, 2006; Rodríguez-Viva *et al.* 2014). El manejo integral de garrapatas consiste en la apropiada combinación de al menos dos herramientas de control con el objetivo de para romper el equilibrio de poblaciones (Rodríguez-Vivas *et al.* 2014; Moncada *et al.* 2015).

5.6.1. GENERALIDADES DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

El termino entomopatógeno se ha definido por varios autores de distinta manera, algunos lo definen como aquellos microorganismos bacterias, hongos,

virus, y nematodos que son capaces de atacar ácaros, insectos y artrópodos (García *et al.* 2008), la aparición natural de entomopatógenos es considerado como un importante factor en la regulación de poblaciones artrópodos, los hongos son un grupo de microorganismos filogenéticamente diversos, heterotróficos, eucariontes, unicelulares o hifales (filamentoso), que presentan reproducción por esporas sexuales, asexuales o ambas, (Albuquerque y Albuquerque, 2009). Los hongos entomopatógenos se encuentran en la división Eumycota y en las subdivisiones Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina, Deuteromycotina, (García *et al.* 2008), asimismo, son un amplio grupo de micro-organismos que proveen múltiples servicios a los sistemas agroecológicos, causando epizootias sobre insectos que reducen significativamente sus poblaciones, tienen un gran potencial como agentes controladores, constituyendo un grupo con más de 750 especies, diseminados en el medio ambiente y provocando infecciones fungosas a poblaciones de artrópodos (Motta-Delgado y Murcia-Ordoñez, 2011), con una alta capacidad de esporulación y sobrevivencia (García *et al.* 2008). *M. anisopliae* hongo anamorfo que parasita a insectos y ácaros, fue aislado por primera vez en 1879 del escarabajo *Anisoplia austriaca* Herbst por Metchnikoff, quien sugiere su uso por primera vez como agente microbiano para el control de insectos (Ojeda-Chi *et al.* 2011). Petch en 1925 define como hongo entomopatógeno el que tiene la capacidad de invadir y matar sus huéspedes artrópodos (Evans, 1993). Los hongos entomopatógenos son efectivos contra las plagas, no contaminan al medio ambiente, no destruyen insectos benéficos, no son tóxicos para los humanos, no desarrollan resistencia y no dejan residuos en los alimentos (Bazán, 2002; García *et al.* 2008).

5.6.2. *Metarhizium anisopliae* COMO AGENTE CONTROL

Metarhizium anisopliae es un hongo entomopatógeno conocido comúnmente como Muscardina verde, ya que es el agente causal de dicha enfermedad (Valverde-Sánchez *et al.* 2015), ha sido un modelo de estudio del control biológico, caracterizado por presentar conidióforos que forman una capa de esporas, las fialides pueden ser solas, en pares o en manojos, los conidios se producen en cadena de basipetalos compactados en columnas, son ovoides o cilíndricos, pueden ser hialinos o ligeramente pigmentados de verde olivo con un tamaño de 7-9 μm de largo y 4.5-5 μm de ancho (Acosta, 2006). El hongo es mesófilo con una temperatura óptima para germinación y crecimiento de 25 a 30°C, una máxima de 32 a 35°C, y una mínima de 10 a 12°C, la mayoría de los hongos que son patógenos tienen un impacto ambiental insignificante, la importancia del uso de tratamientos alternativos como el control biológico el cual se puede realizar con *Metarhizium anisopliae*, esta especie de hongos es patógeno para diferentes especies de garrapatas incluyendo a *Ixodes scapularis*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma variegatum*, *Boophilus microplus* y *Boophilus annulatus* (Fernández-Ruvalcaba, 2005). El género *Metarhizium* se han reportado siete especies; *M. anisopliae* (Metschn) Sorokin, *M. flavoviride* (Gams y Rozypal), *M. album* (Petch), *M. pingshaeme* (Chem y Giro), *M. guizhousense* (Chem y Giro), *M. taii* (Liang y Liu) (Acosta, 2006).

5.6.3. PROCESO INFECTIVO DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN LOS ÁCAROS

Los hongos son los únicos patógenos de ácaros que invaden al hospedante a través del tegumento (Albuquerque y Albuquerque, 2009; García *et al.* 2008), por

medio de un proceso mecánico enzimático, que permite la entrada del hongo al insecto se produce a través de aberturas naturales (boca, espiráculo y ano) (France *et al.* 2000). Para ello presenta varias fases de desarrollo durante la micosis. El proceso infeccioso hongo-ácaro se esquematiza en la figura 5.

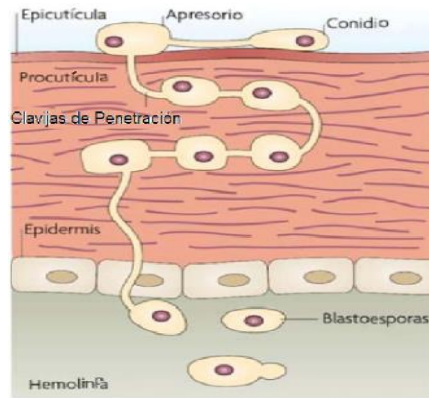


Foto 5. Proceso infeccioso de los hongos entomopatógenos tomada de Thomas y Read, 2007.

5.6.4. ADHERENCIA DE LOS CONIDIOS A LA CUTÍCULA DEL ÁCARO

El proceso se inicia cuando la espora o conidio se adhiere a la cutícula de la garrapata y consiste en la unión del propágulo fúngico a la cutícula del hospedante, dicha unión implica mecanismos no específicos de adhesión controlados por las propiedades hidrofóbicas de la pared celular del conidio, las propiedades hidrofóbicas se deben a la presencia de proteínas en la pared celular llamadas hidrofobinas (France *et al.* 2000; García, 2012).

5.6.5. GERMINACIÓN DE LOS CONIDIOS

La germinación ocurre cuando la conidia encuentra condiciones favorables de humedad, temperatura y requerimientos nutricionales en la cutícula pudiendo producir estructuras de penetración como tubos germinativos. Por otro lado los

lípidos epicuticulares de los insectos pueden ser importantes para la unión del hongo con la cutícula del hospedero, se indican dos posibles papeles para los lípidos epicuticulares de los insectos en su relación con los hongos entomopatógenos: el primero sería hacer poco accesibles las fuentes de energía para la germinación de las conidias y el segundo podría ser una actividad específica antifúngica que podría inhibir el crecimiento de las hifas (Lecuona, 1997).

5.6.6. PENETRACIÓN AL TEGUMENTO DEL HOSPEDERO

La penetración del hongo a través de la cutícula del hospedero implica de dos procesos principalmente, el físico el cual hacen presión las hifas que rompen las áreas membranosas o poco esclerosas, y el otro proceso es el químico resultante de la secreción de enzimas: proteasas, lipasas, y quinasas, que facilitan la descomposición del tegumento (Albuquerque y Albuquerque, 2009; García *et al.* 2008) se ha demostrado que la proteasa es el factor clave en la penetración de la cutícula del acaro por el hongo, ya que está formada por un 70% de proteína lo que explica que sean tan importantes estas enzimas (Borges *et al.* 2010). Las otras áreas más comunes de penetración son la abertura bucal, ano, regiones inter-segmentales y tarso.

5.6.7. CRECIMIENTO DEL HONGO EN EL HEMOCELE

Después de la penetración la hifa se ensancha y ramifica ocurriendo la multiplicación del hongo en el hemocele del acaro por medio de cuerpos hifales, llamadas blastosporas que son estructuras uní y multicelulares que pierden la pared celular pero tienen una delgada capa fibrilar en la membrana plasmática (García *et*

al. 2008). A su vez el ácaro puede responder a la infección a través de mecanismos humorales (fenol-oxidasas, lectina, proteínas, proteínas y péptidos de defensa), celulares (fagocitosis, encapsulación) o ambas. El crecimiento vegetativo en el hemocele del insecto permite al hongo entomopatógeno incrementar la superficie fúngica en contacto con los nutrientes del medio y la dispersión por el sistema circulatorio del acaro. La duración del período de incubación varía entre las especies, sin embargo, el desarrollo de la enfermedad durante la etapa vegetativa es típicamente dependiente de la temperatura.

5.6.8. PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS

Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de sintetizar toxinas que son biocidas sobre los ácaros, utilizadas en el ciclo de relaciones patógenos-hospedante, pueden ser macromoléculas proteicas o moléculas de tamaño medio a pequeño con bajo peso molecular (Albuquerque y Albuquerque, 2009), entre estas se ha encontrado dextruxinas, demetildestruxinas, protodextruxina, ácido oxálico, las cuales son sustancias de baja toxicidad en humanos, pero de mucha actividad tóxica sobre los insectos, ácaros y nematodos (Monzón, 2001), no necesitan requerimientos especiales para su empleo (Borges *et al.* 2010). El efecto de las toxinas en la hemolinfa de los ácaros es la reducción del movimiento de los componentes de la hemolinfa, lo que impide la rápida formación de los granulocitos permitiendo la multiplicación del hongo dentro de este (Acosta, 2006).

5.6.9. MUERTE DEL ACARO

Puede resultar de una combinación de factores como agotamiento de nutrientes, obstrucción física de la circulación de la hemolinfa (García, 2012), invasión de órganos y una toxicosis, los ácaros muertos por *Metarhizium anisopliae* son cubiertos completamente por micelio que continua creciendo saprofiticamente e invade todos los tejidos y órganos, el cual inicialmente es de color blanco pero se torna verde cuando el hongo esporula (Monzón, 2001). Una vez que las hifas atraviesan el tegumento, pueden o no permanecer en fase vegetativa o inician el proceso de esporulación en un periodo de 24 a 48 horas dependiendo la humedad relativa y su dispersión, la diseminación depende de la acción del viento, agua, hombre u otro organismo que sirva como transporte o diseminador (Albuquerque y Albuquerque, 2009). Al ser una enfermedad progresiva, el número de células en del hemocele disminuye, cuando el hongo muestra un incremento, se producen cambios en la composición del hemocele pasando de pH ácido a cercano a la neutralidad, presentándose con mayor viscosidad y los aminoácidos desaparecen (Acosta, 2006).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

La colecta de garrapatas se realizara en las colonias del municipio de Torreón Coahuila México, éste se encuentra localizado en la región semidesértica del norte de México a una altura entre 1120 msnm, entre los paralelos 25° 42' y 24° 48' N y los meridianos 103° 31' y 102° 58' O, esta zona presenta un clima muy seco semicalido 89% y seco templado 11%, con un rango de precipitación de 100-400 mm, con temperatura entre 14- 22°C (INEGI, 2009). De los caninos infestados naturalmente, se obtuvieron las garrapatas de genero *R.sanguineus*, luego se

trasladara al laboratorio del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de Matamoros Coahuila, en viales para su identificación uso posterior.

6.1. SEGREGACIÓN DE *Metarhizium* sp.

Partiendo de un aislado de *Metarhizium* sp., el cual había tenido una inconsistente esporulación en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA), se resembró por estrías en medio de cultivo (PDA) para obtener un cultivo madre. El medio PDA se preparó al utilizar una infusión de trocitos de papa 200 gramos, Dextrosa 20 gramos y agar bacteriológico 15 gramos, todas las cantidades son para 1 litro. Todos los medios de cultivo (500 ml) se prepararán en matraces Erlenmeyer de 1 L, los cuales se esterilizarán a 15 psi por 15 minutos. Posteriormente, bajo condiciones de asepsia se vaciarán en cajas Petri previamente esterilizadas, en autoclave a 15 psi por 60 minutos.

A continuación, se inocularon cinco garrapatas vivas al ponerlas en contacto en medio de cultivo donde el hongo ya había esporulado (cultivo de 14 días). Después de dos semanas de inoculadas las garrapatas con *Metarhizium* sp., se formaron esporas del hongo. Con un asa de siembra microbiológica, se recolectaron las esporas formadas encima de las garrapatas y se depositaron en un tubo de ensayo que contenían 10 ml de agua destilada estéril. De ésta primera dilución, se realizaron subsecuentes diluciones al tomar 1 ml y pasarlo a tubos de ensayo que contenían 9 ml de agua destilada estéril; la dilución final fue de 10^{-4} , de la cual se tomó 1 ml y se sembró en el medio PDA. (Gómez y Mendoza, 2004). Las placas con PDA en donde aparecieron colonias individuales de *Metarhizium* sp., se

consideraron como aislados segregados distintos, en total fueron 19. Posteriormente, de cada aislado (19) se re-inocularon nuevas garrapatas. Para ello, se usaron cajas Petri que contenía cinco garrapatas vivas por aislado y un algodón estéril humedecido con agua destilada estéril. Por cada aislado, se realizaron tres cajas Petri con garrapatas, las que se incubaron hasta por 14 días a 27 ° C, de las garrapatas inoculadas con el hongo se evaluó micelio presente, esporulación y mortandad de los ácaros. La patogenicidad de los aislados se conformó al sumar la presencia del micelio de *Metarhizium* sp. más su esporulación sobre las garrapatas. Como testigo, se dejaron cinco garrapatas sin inocular.

6.2. SELECCIÓN, AISLAMIENTOS, SEGREGADOS

Una segunda re-inoculación del hongo se realizó al tomar esporas de las garrapatas y sembrarlas en los medios PDA y Sabourand (Dextrosa, 40 g; Peptona, 10 g; Extracto de levadura, 10 g; Extracto de malta 10 g; Agar Bacteriológico, 15 g. todo por cada litro de agua destilada). Las cajas inoculadas con los hongos se incubaron por 20 días a 27 ° C. Aquí, solo se evaluó cualitativamente la esporulación en ambos medios de cultivo. De las cajas de PDA y Sabourand donde se observó mejor esporulación del hongo, se usaron para re-inocular nuevas garrapatas (cinco por cada caja Petri) de la manera descrita. Aquí, se evaluaron micelio presente, esporulación, mortandad y patogenicidad en los ácaros de la manera señalada.

Una tercera re-inoculación del hongo (sobre las garrapatas) al medio PDA y de éste a las garrapatas se efectuó, de manera señalada anteriormente.

6.3. ESPORULACIÓN DEL HONGO EN MEDIO DE CULTIVO

Al inicio del trabajo, el aislado original esporula escasamente en PDA y lo hacía de manera tardíamente en medio Sabourand. Inmediatamente después de la producción de esporas sobre el ácaro, esporas del hongo se transferían a medio PDA y/o Sabourand para determinar cualitativamente su esporulación. La escala arbitraria utilizada para la esporulación fue visual, en donde +, ++, +++ y ++++ indica 25, 50, 75 y 100 % de esporulación en la placa, respectivamente en ambos medios PDA o Sabourand.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las medias de las variables: ácaros vivos, muertos, con micelio u esporas y patogenicidad se obtuvieron para cada ensayo en donde se inocularon las garrapatas con *Metarhizium* sp. La prueba ji-cuadrada se aplicó para determinar la posible relación entre las variables aludidas con un nivel de significancia de $P = 0.05$ (Olivares, 2012). Intervalos de confianza (99 %) se obtuvo para la patogenicidad de los ácaros segregados (19 aislados x 3 repeticiones $n=57$), utilizando la fórmula:

$$\left(\bar{x} - z_{\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \bar{x} + z_{\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right)$$

\bar{x} , z_{α} , σ y n representan la media, valor crítico de tabla de Z, desviación estándar y tamaño de muestra, respectivamente. La hipótesis de que la patogenicidad de los aislados seleccionados pudiese incrementarse con respecto a los 19 aislados iniciales fue evaluada al implementar el intervalo de confianza de ésta población y contrastarlo con las medias de las inoculaciones segundas y tercera.

8. RESULTADOS

En la tabla 1 se observa el comportamiento de las garrapatas al inocularse con las 19 segregaciones del hongo. Al aplicarse la prueba ji-cuadrada, el análisis mostró que no hubo una relación entre las variables cualitativas de la investigación como fueron garrapatas vivas, muertas, con presencia de micelio y presencia de esporas del hongo sobre el acaro, siendo independientes y se encontró que no hubo diferencia significativa con la probabilidad $P = 0.05$. Interpretando lo anterior, que la muerte de la garrapata se obtuvo con presencia o no de micelio, en algunas se encontró esporulación o no del hongo y algunas garrapatas sobrevivieron aún después de ser invadidas Figura 6.



Figura 6. Garrapata muerta no invadida (izquierda); invadidas por *Metarhizium* sp.; (centro); no invadida y aún viva (derecha).

Los resultados expresados como Medias de las garrapatas vivas, muertas, invadidas por el micelio y esporulación del hongo más patogenicidad se todos los ensayos se muestran en las Tablas 1 a 4. La patogenicidad del primer ensayo, donde el hongo fue segregado y seleccionados 19 aislados (Cuadro 1) fue de 0.39 con un intervalo de confianza del 99 %, por tanto su media de patogenicidad osciló de 2.96 (3.30-0.39) a 3.74 (3.30+0.39).

Los Medias de patogenicidad de los subsecuentes ensayos fueron 5.00 para la segunda inoculación de los ácaros y esporas provenientes del medio Sabourand (Cuadro 2); 4.7 para la segunda inoculación de los ácaros y esporas provenientes del PDA (Cuadro 3); y 4.5 para la tercera inoculación de los ácaros y esporas provenientes del PDA (Cuadro 4). Consecuentemente, las medias de patogenicidad entre los 19 aislados originales y los seleccionados en la segunda y tercera inoculación son distintos, según el intervalo de confianza obtenido para los asilados iniciales (media 3.30 ± 0.39 , P = 99 %).

Cuadro 1. Comportamiento de las garrapatas al inocularse con las 19 segregaciones de *Metarhizium* sp.

Numero de segregación	£Media de				
	Vivas	Muertas	Micelio	Esporulación	Patogenicidad
1	1.0	4.0	2.0	3.0	5.0
2	0.3	4.7	3.3	0.0	3.3
3	0.0	5.0	2.0	1.0	3.0
4	0.0	5.0	1.7	1.3	3.0
5	0.0	5.0	2.0	3.0	5.0
6	0.7	4.0	0.3	2.0	2.3
7	0.3	4.7	2.3	0.7	3.0
8	1.3	3.7	2.7	1.3	4.0

9	0.0	5.0	2.7	2.0	4.7
10	0.0	5.0	1.7	2.3	4.0
11	0.0	5.0	1.0	1.0	2.0
12	0.0	5.0	2.3	2.0	4.3
13	0.7	4.3	3.0	1.0	4.0
14	0.7	4.3	2.0	2.0	4.0
15	0.0	5.0	1.7	0.3	2.0
16	0.7	4.3	1.7	1.3	3.0
17	0.7	4.3	0.7	0.0	0.7
18	0.0	5.0	1.3	1.0	2.3
19	0.0	5.0	2.0	2.0	4.0
Media del total	0.3	4.6	1.9	1.4	3.3

£Media obtenida de tres repeticiones con cinco garrapatas por repetición.

Cuadro 2. Comportamiento de las garrapatas al re-inocularse (2^o) con *Metarhizium sp.*, el medio de cultivo de donde provinieron los aislados fue el SAB

Numero de segregación	£Media de				
	Vivas	Muertas	Micelio	Esporulación	Patogenicidad
1	0	5	2	3	5
4	1	4	4	1	5
5	1	4	3	2	5
6	0	5	3	2	5
8	0	5	3	2	5
12	0	5	3	2	5
14	0	5	4	1	5
Media del total	0.3	4.7	3.1	1.9	5.0

£ Media obtenida de tres repeticiones con cinco garrapatas por repetición.

Cuadro 3. Comportamiento de las garrapatas al re-inocularse (2^o) con *Metarhizium sp.*, el medio de cultivo de donde provinieron los aislados fue el PDA

£Media de				
-----------	--	--	--	--

Numero de segregación	Vivas	Muertas	Micelio	Esporulación	Patogenicidad
1	0	5	2	3	5
5	0	5	3	2	5
6	0	5	3	2	5
8	0	5	5	0	5
10	0	5	3	2	5
12	0	5	3	1	4
13	0	5	1	3	4
14	1	4	1	3	4
15	0	5	1	4	5
Media del total	0.1	4.9	2.4	2.2	4.7

£Media obtenida de tres repeticiones con cinco garrapatas por repetición.

Cuadro4. Comportamiento de las garrapatas al re-inocularse (3º) con *Metarhizium* sp., el medio de cultivo de donde provinieron los aislados fue el PDA

Numero de segregación	£Media de				
	Vivas	Muertas	Micelio	Esporulación	Patogenicidad
1	1.0	4.0	2.0	3.0	5.0
6	0.7	4.0	3.0	2.0	5.0
10	0.3	4.7	1.5	2.5	4.0
13	0.7	4.3	3.0	1.0	4.0
15	0.0	5.0	1.0	3.5	4.5
Media	0.5	4.4	2.1	2.4	4.5

£ Media obtenida de tres repeticiones con cinco garrapatas por repetición.

Los aislados seleccionados por su esporulación fueron el 1, 6, 10, 13 y 15, todos alcanzaron por lo menos una patogenicidad de 4 a partir de la segunda re-

inoculación y un 75 % de esporulación. Una muestra de la esporulación alcanzada por los aislados mencionados e plasma en la Figura 7.

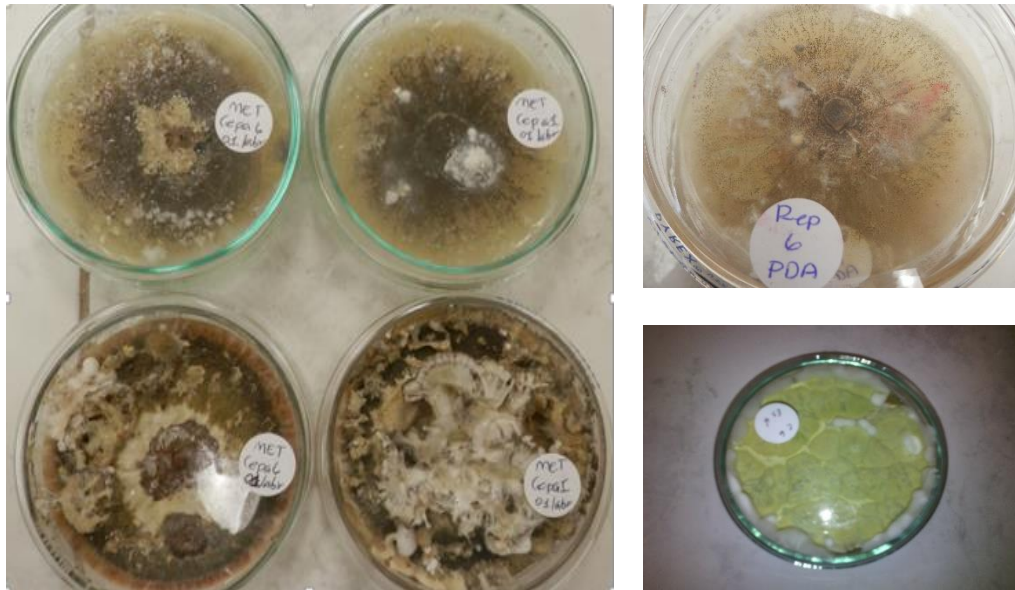


Figura 7. Esporulación de los aislados de *Metarhizium* sp. Superior izquierda, aislados 6 y 1 esporulado en PDA (+++ o 75 %). Inferior izquierda, aislados 6 y 1 esporulado en Sabourand (+++ o 75 %). Superior derecha, aislado original esporulado ++ o 50 % en PDA. Inferior derecha, aislamiento original sin esporular todavía.

9. DISCUSIÓN

El hongo *M. anisopliae* es una especie promisorio para el control biológico de garrapatas (Charnley y Collins, 2007; Alekseev, 2010), en condiciones de laboratorio *M. anisopliae* ha demostrado ser eficaz para el control de *Rhipicephalus sanguineus* (Ojeda-Chi *et al* 2011). La presencia de micelio en los grupos de garrapatas tratadas, indica que *M. anisopliae* fue la causa de mortalidad (Fernández-Ruvalcaba *et al.* 2005). Los ácaros que no murieron durante los 14 días de inoculación, se dejaron más tiempo para tratar de observar esporulación. La

causa principal es la existencia de organismos resistentes que pueden sobrevivir por mas días a la infección fúngica o viceversa otros pueden morir a una posible infección del hemocele con microorganismos oportunistas, por ello no se encontró relación de garrapatas vivas, muertas, con micelio y esporulación, porque es un evento biológico en el cual el parasitismo del hongo entomopatógeno no es siempre lineal de parasitismo-muerte. Los ácaros como cualquier insecto pueden tener ciertas diferencias de microorganismos que habitan de manera normal en ellos o que se encuentran como portadores, como citan algunos autores; *Babesia spp.*, *Theileria spp.*, bacterias; *Rickettsias spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.*, virus; *Nairovirus*, *Flavivirus*, *Asfavirus* (Ramírez-Barrios *et al.* 2008; Alekseev, 2010; Rosario *et al.* 2010; Domínguez, 2011; Rubio *et al.* 2015), malaria o paludismo (Qviller *et al.* 2014). Un estudio hecho por Acosta en 2006, menciona que existen proteínas (péptidos) que son segregados por las garrapatas para inhibir el desarrollo de *M. anisopliae*, con ello explica el por qué no se desarrolla micelio ni esporulación en algunos ácaros.

La esporulación se incrementa debido a que el hongo se revitaliza conforme se re-inocula en organismos vivos (ácaros), ya que obtiene diferentes nutrientes a los que se le pudieran proporcionar en medios artificiales, la obtención de los mejores segregados esporulados durante el trabajo, propicio al aumento de la esporulación en PDA.

Aunque no muestro datos sobre el crecimiento de hongos oportunistas como ocurrió en este trabajo de investigación, el micelio de otro hongo apareció en algunos ácaros, una especie *Aspergillus spp.* ya que puede ser un habitante normal

u oportunista. Lo que se sugiere es hacer un trabajo de investigación sobre microorganismos oportunistas en los ácaros.

Y realizar otro trabajo que pueda evaluar la diseminación de esporas del hongo en suelos donde se tenga la presencia de ácaros en la Comarca Lagunera.

10. CONCLUSIONES

Haciendo segregaciones y re-inoculaciones reiteradas del hongo entomopatógeno *Metarhizium sp.* en las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, incremento la patogenicidad hacia el acaro.

El presente trabajo permite concluir que las segregaciones constantes del hongo con el acaro aumenta notablemente la actividad patogénica sobre la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*.

La esporulación de *Metarhiziumsp.* en agar PDA, incremento notablemente la esporulación después de haber hecho las diferentes segregaciones y someterlo en contacto con los ácaros.

11. LITERATURA CITADA

- Acero, M. E. J., Calixto, O. J., Camilo, P. A. 2011. Garrapatas (Acari: *Ixodidae*) prevalentes en caninos no migrantes del noroccidente de Bogotá, Colombia. Nova Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 9 (15). pp. 158-165.
- Acosta, V. J. A. 2006. Tesis. Evaluación de hongos entomopatógenos como controladores biológicos de *Scutigerella immaculata*. Pontificia universidad javeriana facultad de ciencias carrera de microbiología agrícola y veterinaria. Bogotá. pp. 1-79.
- Albuquerque, M. E. A., Albuquerque, M. E. H. 2009. Hongos entomopatógenos: importante herramienta para el control de “moscas blancas” (*Homoptera: Aleyrodidae*). Anais da academia Pernambucana de ciencia agronómica. 5 (6). pp. 209-242.
- Alekseev, A. N. 2010. Environmentally safe control of tick's use of ixodes (acarina *ixodidae*) tick sexual behavior peculiarities for pathogenic fungal effect reinforcement. International Journal of Acarology, 37. pp. 156-165.
- Alonso- Díaz, M. A., Rodríguez- vivaz, R. I., Fragoso-Sánchez, H., Rosario-Cruz. 2006. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodíidas. Revista Archivos de Medicina Veterinaria. 38 (2). pp. 105-113.
- Álvarez-Hernández, G., Candía-Plata, M. C., Bolado-Martínez, E., Delgado-de la Mora, J., Soto-Guzmán, A., López-Soto, L. F. 2015. Fiebre manchada por *Rickettsias rickettsii* en las Américas: un problema creciente de salud pública. RevUnivInd Santander Salud. 45 (3). pp. 1-36.
- Arguedas, M., Álvarez, V., Bonilla, R. 2008. Eficacia del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en el control de *Boophilus microplus* (Acari: *Ixodidae*). Agronomía Costarricense. 32 (2). pp. 137-147.
- Argueta, A. I. N. 2011. Tesis. Evaluación del hongo entomopatógenos *Verticillium lecanii* (*zimmerman*) viegas como bio-controlador de garrapatas en

- perros (*Canis domesticus*). Universidad de el Salvador, Facultad de ciencias Agronómicas. Ciudad Universitaria, el Salvador. pp. 1-99.
- Arrieta, P. M., Ferrándiz, S., Rayón, E., López, J. 2013. Cambios en la estructura cuticular *Ornithodoros erraticus* hembra durante el proceso de alimentación. *Gayana*. 77 (1). pp. 43-52.
- Ayra, L., Cabrera, I., Gómez, M., Hernández, D. (Sin fecha). Empleo de marcadores bioquímicos y de ADN en la caracterización molecular de hongos entomopatógenos. Instituto de Investigación en Fruticultura Tropical, la Habana, Cuba. pp. 1-18.
- Bautista, G. C. R. 1987. Interacción artrópodo-respuesta inmune del huésped. Departamento de Parasitología (división de estudios de Posgrado), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. pp. 87-130.
- Bazán, T. M. 2002. Tesis de Maestría. Efecto de *Metarhizium anisopliae* en el control biológico de *Boophilus microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae) en ganado bovino estabulado. Universidad Colima, Área de Biotecnología. pp. 1-91.
- Beltrán, A., Gutiérrez, G. A. I., Saldarriaga, O. Y. (2008). Patogenicidad de *Lecanicillium lecanii* (fungi) sobre la garrapata *Boophilus microplus* (acari: ixodidae) en laboratorio. *Revista Colombiana de Entomología*.(1): 90-97.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., Humber, R. A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*. 101, (4). pp. 512-530.
- Borges, D., Díaz, A., San Juan, A. N., Gómez, E. 2010. Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar*. 44 (3). pp. 49-55.
- Botello, A. R., Botello, A. L., Borroto, C. N., Suarez, M., Pérez, D. A., Rodríguez, Y. V., Fajardo, H., Pérez, K. C., González, A. O., Rodríguez, A. N., Linares, B. R., Colicchia, M. R., Gómez, I. A., Peraza, P. S., Gort, A. M. 2011. Control de garrapatas *Boophilus microplus* en bovinos con el inmunogeno Herber biogar. *Revista electrónica de Veterinaria*, 12 (5). pp. 1-10.

- Bram, R. A. 1994. Integrated control of ectoparasites. In: Ectoparasites of animals and control methods. Revuescientifique et technique International office of Epizootics. 13. pp. 1357-1365.
- Cafarchia, C., Immediato, D., Latta, R., Nascimento, R. R. A., Paolo, L. R., Porretta, D., Aguiar, F. L., Dantas-Torres, F., Otranto, D. 2015. Native Strains of *Beauveria Bassiana* for the control of *Rhipicephalus sanguineussensulato*. Parasites y Vectors. 8 (80). pp. 1-7.
- Cantú, C. A., García, V. Z. 2013. Estrategias para el control integrado de garrapata (*Boophilus* spp.) en la producción de bovinos de carne en pastoreo. Instituto Nacional de Investigación Forestal Agrícola y Pecuario. pp. 1-54.
- Castillo-Martínez, A., Cueto-Medina, S. M., Hernández-Rodríguez, S., Valdés-Perezgasga, M. T., Ortega-Morales, A. I. 2015. Garrapatas Peridomésticas (Acari: *Ixodidae*, *Argasidae*) de Matamoros, Coahuila, México. Entomología Mexicana. 2. pp. 47-51.
- Charnley, A.K., S.A. Collins, 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Kubicek, C.P., I.S. Druzhinina (eds.), Environmental and Microbial Relationship. The Mycota IV. Springer–Verlag Belin Heidelberg. pp. 159–187.
- Cortés, J. A. 2010. Cambios en la distribución y abundancia de lasgarrapatas y surelación con el calentamiento global. Rev. Med. Vet. Zoot. 57 (1). pp. 1-11.
- Debárbora, V. N., Oscherov, E. B., Guglielmone, A. A., Nava, S. 2011. Ticks (Acari: *Ixodidae*) of dogs in different environments of the Corrientes province, Argentina. Investigación Veterinaria. 13 (1). pp. 45-51.
- Domínguez, A. G. G. 2011. Tesis. Prevalencia e identificación de hemoparasitos (*Ehrlichia canis*, *Babesia canis* y *Anaplasma phagocytophilum*) enperros de la ciudad de Cuenca. Universidad de Cuenca, facultad de ciencias agropecuarias escuela de medicina veterinaria y zootecnia. Cuenca, Ecuador. pp. 1-164.

- Estrada-Peña A., Ayllón, N., De la Fuente, J. 2012. Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. *Front. Physio. Spain*. pp. 1-12.
- Estrada-Peña, A. 2006. Prediction of habitat suitability for ticks. Department of parasitology, Veterinary Faculty, Zaragoza Spain. pp. 275-284.
- Evans, H. C. 1993. Concurrent use and potential of entomopathogen fungi for biological control of arthropod pests. *Revista Palmas*. 14 (1). pp.37-46.
- Faccioli, V. 2011. Garrapatas (acarí: *Ixodidae* y *Argasidae*) de la colección de invertebrados del museo provincial de ciencias naturales Florentino Ameghino. Serie Catálogos, Argentina. 25. pp. 1-38.
- Fernández-Ruvalcaba, M., Elyes, Z., García- Vázquez, Z. 2005. Inefectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra la cepa de garrapatas *Boophilus microplus* sensibles y resistentes a los organofosforados. *Revista Técnica Pecuaria en México*, 43, (3). pp. 433-440.
- Fernández-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R. I., Alonso-Díaz, M. A., 2011. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Veterinary parasitology*. 183. pp. 338-342.
- France, I. A., Gerding, G. M., Gerding, P. M., Sandoval, V. A. 2000. Pathogenicity of a Chilean wild collection of *Metarhizium* spp. and *Beauveria* spp. on *Aegorhinus superciliosus*, *Asynonychus cervinus* and *Otiorhynchus sulcatus*. Instituto de Investigación Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Casillas 426, Chillan, Chile. pp. 1-14.
- García, G. M. A., Cappello, G. S., Lesher, G. J. M., Molina, M. R. F. 2008. Hongos entomopatógenos como alternativa en el control biológico. División académica de ciencias biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. pp. 25-29.
- García, M. E., Moissant, E., Pérez, A., Quijada, J., Simoes, D., García, H. 2007. Comportamiento natural de las fases no parasíticas de *Rhipicephalus*

- sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: *Ixodidae*) en un bioterio canino de Venezuela. *Revista Científica*. 18 (6). pp. 566-571.
- García, O. N. 2012. Tesis. Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var *lepidiotum* en atmosferas oxidantes. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. pp. 1-62.
- Gómez, P. P., Mendoza, M. J. 2004. Guía para la producción de *Metarhizium anisopliae*. Centro de Investigación de la caña de azúcar del Ecuador. Publicación técnica. 5. pp. 1- 13.
- González-Sáenz, J.R. 2009. *Boophilus microplus*: Estado actual de la resistencia a los acaricidas en la frontera México- Estados Unidos y su impacto en la relación comercial. II Simposio Internacional de la resistencia a pesticidas. Mérida, Yucatán. México. 30-34.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2009. (En línea). <http://www.inegi.org.mx/>. (25 de mayo del 2016).
- Jaworski, D. C., Zou, Z., Bowen, C. J., Wasala, N. B., Madden, R., Wang, Y., Kocan, K. M., Jiang, H., Dillwith, J. W. 2010. Pyrosequencing and characterization of immune response genes from the American dog tick *Dermacentor Variabilis*. *Insect Molecular Biology* 19 (5). pp. 617-630.
- Lecuona, R., Clemant, J. L., Riba, G., Joulie, C., Juarez, P. 1997. Spore germination and hyphal growth of *Beauveria* sp. on insect lipids. *Journal of Economic Entomology*, 90. pp. 119-123.
- López, E., G. López and S. Orduz. 2009. "Control de la garrapata *Boophilus microplus* con *Metarhizium anisopliae*, estudios de laboratorio y campo." *Revista Colombiana de Entomología*. 35: 42-46.
- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., Pérez-Sánchez, R. 2012. Garrapatas: Características anatómicas, epidemiológicas y ciclo vital. Detalles de la influencia de las garrapatas sobre la producción y sanidad animal. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, España. pp. 1-8.

- Martinez-Tinajero, J. J., Izaguirre-Flores, F., Aguirre-Medina, J. F., Ley de Coss, A., Osorio-Lopez, M. W., Juaregui-Jimenez, R. 2016. Control biologico de garrapata *Boophilus* spp. con diferenres cepas de *Metarhizium anisopliae* Metchmikoff Sorokin en bovinos. Sitio Argentino de Produccion Animal. pp. 1-7.
- Miller, R. J., Li, A. Y., Davey, R. B., George, J.E. 2006. The use for the determination of the mechanisms of acaricida resistance in the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae). Simposium Internacional de Resistencia a Pesticidas en Artrópodos: Un enfoque Toxicológico y Molecular. Manzanillo, Colima, México. Mayo 2006. Pp. 29-35.
- Moncada, G. A. C., Villar, A. D., Chaparro, G. J. J., Angulo, A. J., Mahecha, L. L. M. 2015. Approach to the use of entomopathogenic fungi and vaccines paragraph sustainable control of ticks in farming systems: review. Avances en Investigación Agropecuaria. 19, (3). pp. 55-71.
- Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo integral de plagas Costa Rica. 63. pp. 95-103.
- Morales-Soto, M., Cruz-Vázquez, C. 1998. Fluctuaciones poblacionales de *Rhipicephalus sanguineus*, garrapata parásita de perros, en el valle de Cuernavaca, Morelos, México. Estudio preliminar. Revista Vet. Méx. 29 (3). pp. 299-301.
- Motta-Delgado, P. A., Murcia-Ordoñez, B. 2011. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. Revista Ambiente y agua-An Interdisciplinary Journal of Applied Science. 6 (2). pp. 77-90.
- Ojeda-Chí, M. M., Rodríguez-Vivas, R. I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., Cruz-Vázquez, C. 2011. Control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) using the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Review. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 2 (2). pp. 177-192.
- Olivares, S. E. 2012. Tabla de Contingencias. Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Version1.1 de prueba.

- Pérez, T. M., Guzmán-Cornejo, C., Montiel-Parra, G., Paredes-León, R., Rivas G. 2014. Biodiversidad de ácaros en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85. pp. 399-407,
- Qviller, L., Grova, L., Viljugrein, H., Klingen, I., Mysterud, A. 2014. Temporal pattern of questing tick *Ixodes ricinus* density at differing elevations in the coastal region of western Norway. *Parasites and Vectors*, 7 (179). pp. 1-25.
- Ramírez-Barrios, R. A., Chacín, E., Barboza, G., Fernández, G., Valera, Z., Villalobos, A., Angulo-Cubillán, F. 2008. Garrapatas (acari: ixodidae) recolectadas de caninos bajo asistencia veterinaria en Maracaibo, Venezuela. *Revista Científica*. 18 (3). pp. 267-270.
- Rodríguez-Alcocer, U. J., Rodríguez-Vivas, R. I., Ojeda-Chi, M. M., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R. 2014. Eficacia de la mezcla de dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) para el control de *Rhipicephalus microplus* infestaciones naturales en bovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 17. pp. 223-229.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Rosado-Aguilar, J. A., Ojeda-Chi, M. M., Pérez-Cogollo, L. C., Trinidad-Martínez, I., Bolio-González M. E. 2014. Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*. 1. pp. 295-308.
- Rosario, C. R., Dominguez, G. D. I., Rojas, R. E., Ortiz, E. M., Martinez, I. F. 2010. estrategias para el control de la garrapata *Boophilus microplus* y la mitigación de la resistencia a los pesticidas. Primer Simposium de Salud y Producción de Bovinos de Carne en la Zona Norte-Centro de México. Aguascalientes, aguascalientes. pp. 1-22.
- Rubio, R. M. C., Gaxiola, C. S. M., Enríquez, V. I., Cota, G. S. C., Castro, C. N. 2015. *Rhipicephalus sanguineus* en caninos en Sinaloa, México. *Revista electrónica de Veterinaria*. 16 (3). pp. 1-10.
- Téllez-Jurado, A., Cruz-Ramírez, M. G., Mercado-Flores, Y., Asaff-Torres, A., Arana-Cuenca, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la

- relación de hongos entomopatógenos e insectos. Revista mexicana de micología. pp. 73-80.
- Thomas, M., Read, A. 2007. Can fungal biopesticides control malaria. Nature Reviews Microbiology. 5 (5). pp. 377-382.
- Valverde-Sanchez, A. L., Mata-Granados, X., Lezema-Gutierrez, R., Camacho-Calvo, M. 2015. *Metarhizium anisopliae* como mico.acaricida para el control de la garrapaa *Rhipicephalus microplus*. Revista Iberoamericana de Ciencias. 2 (6). pp. 1-18.
- Vásquez, L. C., Muro, J. J., Clavijo, J. J. 2011. Garrapatas del género *Ixodes Latreille*, 1795 y *Rhipicephalus Boophilus* Koch 1844 (Acari: Ixodidae) presentes en la colección de Zoología Agrícola, decanato de Agronomía, UCLA, Lara, Venezuela. Entomotropica. 26 (2). pp. 89-97.
- Willadsen, P. 2006. Tick control: Thoughts on a research agenda. Veterinary Parasitology. 138. pp. 161-168.

12. ANEXOS.



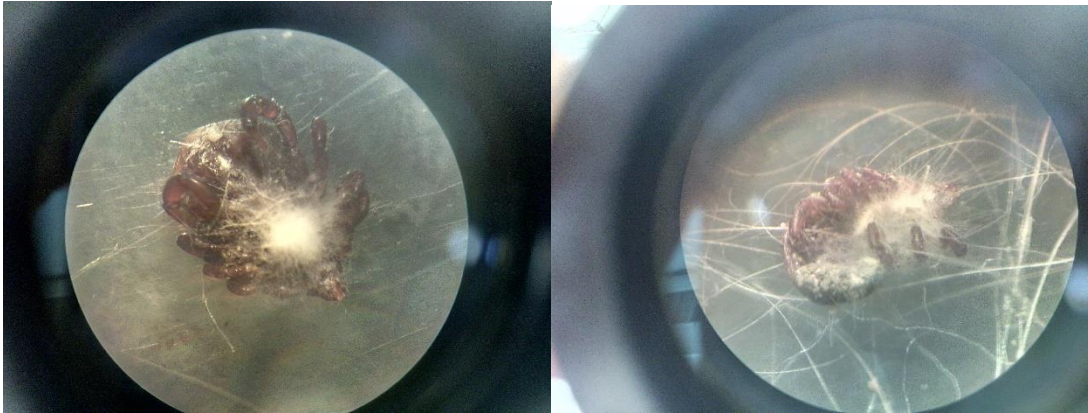
Laboratorio INIFAP Matamoros, Coahuila, México. Preparación de medio de cultivo PDA.



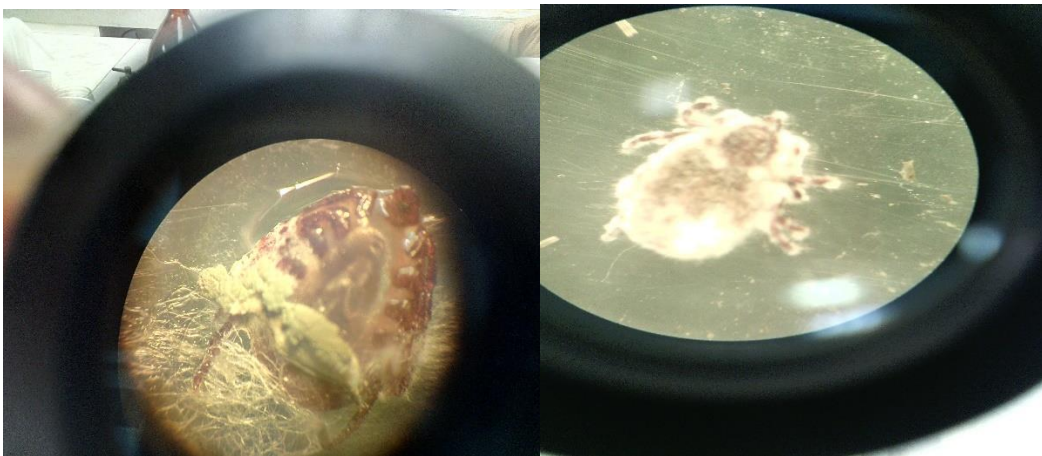
Preparación de los agares en las cajas de Petri.



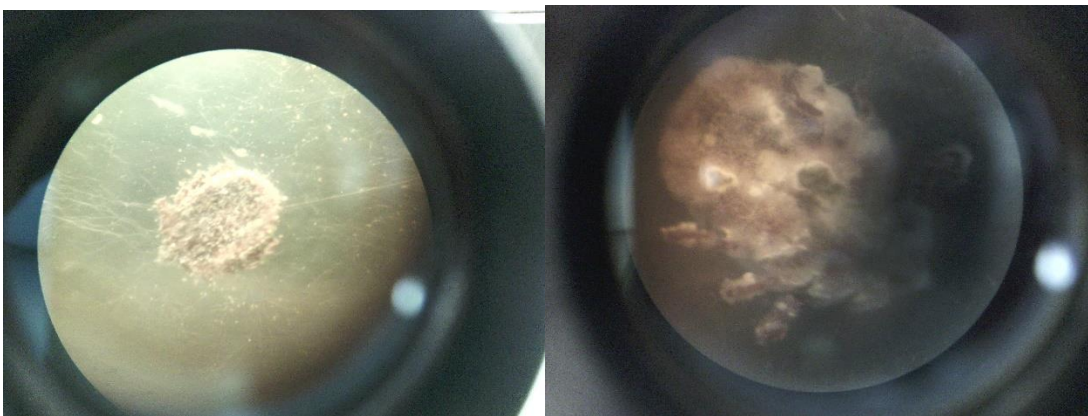
Crecimiento de colonias 6 días después de haberse sembrado.



Garrapatas del genero *R. sanguineus* con presencia de micelio.



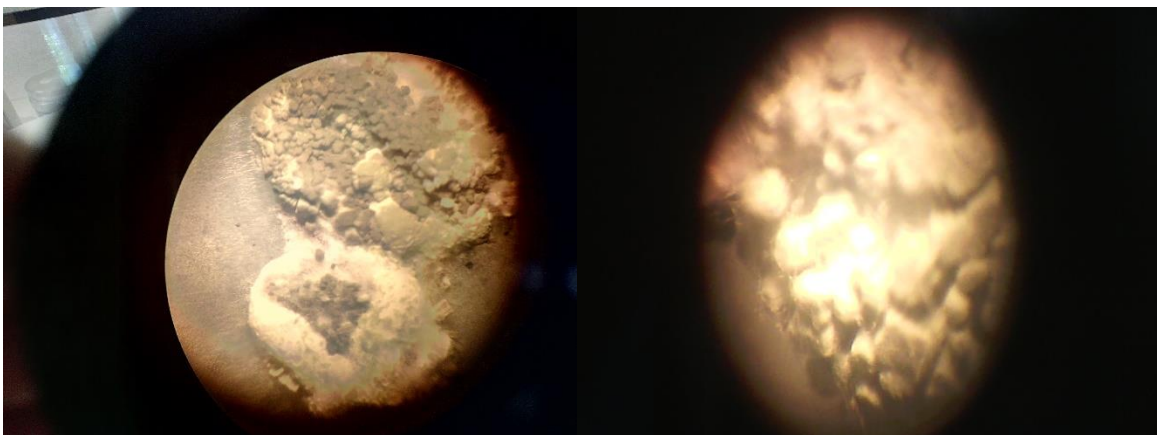
Garrapatas inoculas ambas con presencia de micelio.



Presencia de micelio con esporas del hongo entomopat6geno *M. anisopliae*



Esporulación del hongo entomopatógeno *M. anisopliae*.



Esporulación completa del hongo *M. anisopliae*



Finalización del trabajo de tesis con mi asesor José Luis Covarrubias Castro