

VIRULENCIA DE *Metharhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN Y *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN SOBRE ADULTOS DE *Heterodoxus spiniger*(ENDERLEIN)

✉ Rosa Itzel Palacios-Pacheco¹, Martín Moreno-Ríos¹, Eugenia del Carmen Prieto-Avella¹, Laura Alejandra Arriola-Mosqueda², Roberto Lezama-Gutiérrez³, Enrique Corona-Barrera, César Andrés Angel-Sahagún⁴

✉ Correo: sahadun01@yahoo.com.mx

RESUMEN. El piojo de los perros *Heterodoxus spiniger* es un ectoparásito masticador que puede causar graves daños y enfermedades a sus hospederos. Principalmente estos parásitos se controlan con productos químicos no obstante, su uso irracional ha provocado resistencia en los insectos además de los graves daños al ambiente. El control biológico es una alternativa natural donde se utilizan hongos entomopatógenos como elementos insecticidas. El objetivo del presente estudio fue determinar las CL₅₀ de cepas de hongos entomopatógenos *Metharhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* nativos del estado de Guanajuato sobre adultos de *H. spiniger* en condiciones de laboratorio. Piojos adultos fueron colocados en cajas de Petri y se inocularon por inmersión a las diferentes concentraciones de los aislados evaluados. Los resultados muestran que todos los aislados evaluados tienen efectos bioinsecticidas sobre *H. spiniger* obteniendo una CL₅₀ mínima de 9.30×10^2 conidios/mL y máxima de 2.56×10^5 conidios/mL en diferentes aislados.

Palabras clave: Control biológico, ectoparásito, perro, piojo.

Virulence of *Metharhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin on adult *Heterodoxus spiniger* (Enderlein)

ABSTRACT. Canine lice *Heterodoxus spiniger* is a chewer ectoparasite that can cause serious damage and disease to their hosts. Mainly these parasites are controlled with chemicals, however irrational use has caused insect resistance in addition to serious damage to the environment. The biological control is a natural alternative where entomopathogenic fungi elements are used as insecticides. The aim of this study was to determine the LC₅₀ of strains of entomopathogenic fungi *Metharhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* native of Guanajuato state on adults of *H. spiniger* under laboratory conditions. Adult lice were placed in Petri dishes and inoculated by immersion at the different concentrations of the isolates tested. The results show that all tested isolates have insecticidal effects on *H. spiniger*, obtaining a LC₅₀ minimum of 9.30×10^2 conidios/mL and maximum 2.56×10^5 conidios/mL on different insulates.

Key Words: Biological control, ectoparasite, dog, lice.

INTRODUCCIÓN

La relación entre el hombre y el perro existe desde hace más de 10.000 años, en la actualidad, no solo son animales de trabajo, también actúan como animales de compañía (Benmouyal, 1990). El contacto tan estrecho entre humanos y estos animales aumenta los riesgos de adquirir patógenos zoonóticos, incluyendo parásitos externos como garrapatas, pulgas y piojos. Los piojos *Heterodoxus spiniger* (Enderlein) (Phthiraptera: Amblycera: Boopidae) pertenecen al orden Mallophaga (piojos masticadores) y tiene como hospedero definitivo al perro (*Canis Lupus familiaris*) (Mehlhorn, 2011).

Actualmente las infestaciones por ectoparásitos se eliminan utilizando principalmente productos químicos como Permetrina, Imidaclorip, Ivermectina, entre otros (Boczek et al.,

2014), no obstante su uso irracional ha provocado que las plagas generen resistencia además de mantener residuos en la piel de los animales y el ambiente (Miresmailli *et al.*, 2006). La búsqueda de productos eficaces contra plagas, ha llevado al descubrimiento de nuevos métodos de control entre ellos los biológicos como el uso de los hongos entomopatógenos, reconocidos como importantes enemigos de los insectos (Miresmailli *et al.*, 2006).

Los hongos entomopatógenos son reconocidos como importantes enemigos naturales de plagas de insectos y se pueden utilizar como agentes de control biológico eficaces contra plagas agrícolas y pecuarias, se identifican generalmente basándose en el crecimiento de estos en cadáveres de insectos (Chang-Su *et al.*, 2014). Son excelentes candidatos para su uso en el control biológico debido que no necesitan ser consumido para causar la infección; que infectan a sus anfitriones por el contacto y la penetración directa de la cutícula (Wright *et al.*, 2002).

No existen muchos trabajos en relación a hongos entomopatógenos sobre piojos de caninos, aunque si se han hecho estudios sobre otros artrópodos como larvas de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini) obteniendo micosis del 97.82% en concentraciones de 1×10^8 conidios/mL y una CL_{50} de 2.93×10^5 conidios/mL (Ángel-Sahagún, 2007).

Se ha demostrado la micosis por hongos entomopatógenos de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin sobre los piojos *H. spiniger*, obteniendo mortalidades de mayores a 90% (Ramírez-Jiménez *et al.*, 2013). Por lo tanto son una excelente alternativa considerando su poco efecto colateral hacia otros organismos, la nula resistencia de los insectos y la relación costo beneficio favorable. El propósito del presente trabajo fue determinar la virulencia de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* sobre adultos del piojo *H. spiniger*.

MATERIALES Y MÉTODO

El estudio se realizó en el Laboratorio de Parasitología y Control Biológico (LPCB) del Programa Educativo de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la División Ciencias de la Vida (DICIVA) del Campus Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato, localizado en el Km 7 de la carretera Irapuato-Silao, Exhacienda El Copal, Irapuato, Guanajuato.

Del experimento reportado por Ramírez-Jiménez *et al.* (2013) se realizó la selección de aislados y se tomaron las cepas más sobresalientes en las pruebas de patogenicidad. Inicialmente los cultivos de hongos entomopatógenos se realizaron en Agar Dextrosa Sabouraud, enriquecido con 1% de Extracto de Levadura y 500 ppm de cloranfenicol por 21 días y a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con 12 horas de luz/oscuridad (Samish y Rehacek, 1999). Los conidios fueron colectados mediante raspado del medio de cultivo con ayuda de agua destilada estéril con 0.1% de Tween 80® para romper la tensión superficial, posteriormente se homogenizaron con ayuda de un Vórtex para después cuantificarlas en una cámara hematimétrica de Neubauer (Cañedo y Ames, 2004). Posterior al conteo se formaron las concentraciones de 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 y 1×10^2 conidios/mL. En total se emplearon cinco cepas de *M. anisopliae* (Ma1, Ma3, Ma5, Ma6 y Ma7) y una de *B. bassiana* (Bb2) pertenecientes a la colección de hongos entomopatógenos del LPCB.

Para obtener el insecto plaga se realizó un cepillado de pelaje con peine piojero (1 mm entre cerdas), se colectaron piojos adultos *H. spiniger* de caninos domésticos capturados por el personal técnico del Centro de Atención Canina de Irapuato (CANI) (Ramírez-Jiménez *et al.*, 2013). Para realizar los bioensayos se elaboraron grupos de diez piojos adultos *H. spiniger*, cuatro repeticiones por cada tratamiento y se colocaron sobre cinta con pegamento en cajas de Petri con doble papel filtro para conservar la humedad relativa elevada y favorecer el crecimiento de los hongos entomopatógenos, los piojos colectados fueron utilizados en

menos de cuatro posterior a su colecta. Se utilizaron cuatro repeticiones por cada tratamiento. La inoculación se realizó por inmersión de los piojos durante cinco segundos en la dilución correspondiente, al finalizar se agregó agua destilada estéril al papel filtro con el fin de humedecerlo y se incubaron a una temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$ con 12 horas de luz/obscuridad (Ramírez-Jiménez *et al.*, 2013). A un grupo de diez piojos se le inoculó con aguas destilada estéril con 0.1% de Tween 80® y se le consideró como testigo. Cada 48 horas, con ayuda del microscopio estereoscópico, se registró el número de piojos micosados durante al menos 14 días. Debido a la forma de alimentación de los piojos no se alimentaron.

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis Probit, relacionando el número de adultos micosados y el logaritmo de la concentración de conidios, esto para determinar las concentraciones letales 10, 50 y 90% (Ángel-Sahagún *et al.*, 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a las condiciones en que se realizó el estudio se lograron obtener las concentraciones letales de las cinco cepas utilizadas. Todos los aislados de *M. anisopliae* evaluados demostraron ser patógenos sobre adultos del piojo *H. spiniger*, en condiciones de laboratorio; sin embargo se observó una variación entre aislados.

Los resultados del análisis Probit mostraron que las CL_{50} variaron de 9.30×10^2 a 2.56×10^5 conidios/ml, la cepa más sobresaliente fue la Ma5 y la menos sobresaliente fue la Ma3 respectivamente (Tabla 1). De los aislados evaluados, el más virulento fue Ma5, seguido de Ma6, Ma1, Bb2, Ma7 y el menos virulento fue el Ma3.

Los aislados de Ma3 en concentraciones de 1×10^7 causaron una mortalidad de hasta 100%, Ma6 de 86.7% y Ma7 de 90% valores que guardan relación con los resultados obtenidos por Ramírez-Jiménez *et al.* (2013) aunque el asilado de Ma5 a concentraciones de 1×10^7 conidios/mL obtuvo una micosis de 93.3% contrario a valores obtenidos de 90.6% a concentraciones de 1×10^8 (Ramírez-Jiménez, 2014).

Tabla 1. Valores de CL_{50} de aislados de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre adultos de *H. spiniger*.

Hongo	CL_{50} (conidios/mL)	IC	Ecuación	x2
Ma1	4.96×10^4	$1.91 \times 10^4, 1.28 \times 10^5$	$Y=0.53 X+1.48$	2.35
Ma3	2.56×10^5	$1.35 \times 10^5, 4.86 \times 10^5$	$Y=0.96 X+2.09$	1.32
Ma5	9.30×10^2	$1.55 \times 10^2, 5.59 \times 10^3$	$Y=0.33 X+3.37$	3.94
Ma6	4.58×10^4	$1.78 \times 10^4, 1.17 \times 10^5$	$Y=0.57 X+1.22$	1.40
Ma7	2.50×10^5	$1.02 \times 10^5, 6.11 \times 10^5$	$Y=0.65 X+0.19$	4.17
Bb2	2.16×10^5	$7.08 \times 10^4, 6.59 \times 10^5$	$Y=0.4 X+2.05$	2.85

Los aislados de Ma3 y Ma7 contaron con una CL_{50} de 2.56×10^5 y 2.50×10^5 conidios/mL respectivamente, debido a hasta donde tenemos conocimiento no existen resultados de virulencia reportados sobre el piojo *H. spiniger* son resultados sobresalientes sobre todo si se comparan con los obtenidos sobre larvas de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) con los cuales se obtuvieron CL_{50} de 2.35×10^6 y 2.88×10^7 conidios/mL (Arriola-Mosqueda, 2014), probablemente las características particulares del hospedero utilizado para realizar las evaluaciones favorezca o no la presentación de la infección, del mismo modo para otras especies de ácaros de importancia pecuaria (larvas de *R. microplus*) se encontró que los resultados de las CL_{50} son superiores

(2.93×10^5 conidios/mL) (Ángel-Sahagún, 2007) a las encontradas sobre *H. spiniger* de CL₅₀ de 4.58×10^4 conidios/mL.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al personal técnico y médico del Centro de Atención Canina del H. Ayuntamiento de la ciudad de Irapuato, Guanajuato por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización del presente estudio.

LITERATURA CITADA

- Ángel-Sahagún C.A., Lezama-Gutiérrez R., Molina-Ochoa J., Pescador-Rubio A., Skoda S., Cruz-Vázquez C., Lorenzoni A., Galindo-Velasco H., Fragoso-Sánchez E. (2010). Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus*= *Boophilus microplus* (Acari: Ixocidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. *Veterinary Parasitology*. 170. 278-286.
- Arriola-Mosqueda Laura Alejandra. (2014). Virulencia de hongos entomopatógenos nativos del estado de Guanajuato sobre larvas de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*. Tesis para licenciatura. Universidad de Guanajuato. Irapuato, Gto.
- Benmouyal J. (1990). Un village iroquoien à Deschambault. Rapport déposé au ministère des Affaires culturelles du Québec. Février.
- Boczek A., BartosikandK., Kuczyńsk P. (2014). Sensitivity to permethrin in a *Demacantorreticulatus* population from eastern Poland in laboratory study. *Parasites & Vectors*, 7:18.
- Cañedo, V. y Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa. Perú. Pp: 40-42.
- Chang-Su Kim, Jung-Bok Lee, Beam-Soo Kim, Young-Ho Nam, Kee-Sun Shin, Jin-Won Kim, Jang-Eok Kim, Gi-Seok Kwon. (2014). A Technique for the Prevention of Greenhouse Whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) Using the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* M130. *J. Microbiol. Biotechnol.* (2014), 24(1), 1–7.
- Mehlhorn Heinz, Walldorf Volker, Abdel-Ghaffar Fathy, Al-Quraishy Saleh, Al-Rasheid, Khaled, Mehlhorn Julia. (2011). Biting and bloodsucking lice of dogs—treatment by means of a neem seed extract (MiteStop®, Wash Away Dog). *Parasitol Res.* DOI 10.1007/s00436-011-2613-z
- Miresmailli, S., Bradbury R., Isman M. (2006). Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on two different host plants. *Pest Manag*, 62:366-371.
- Ramírez-Jiménez M.R., Ángel-Sahagún C.A, Ortega-Palomares J.E., Cruz-Avalos A.M., Arriola-Mosqueda L.A., Jiménez-Lara Y., Martínez-Yañez A.R., Lezama-Gutiérrez R. (2013). Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* y *Cordyceps bassiana* sobre adultos del piojo *Heterodoxus Spiniger* (Phthiraptera: Amblycera: Boopidae) en laboratorio. Memoria del XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico presentado en Oaxaca de Juárez, México, el 7 y 8 de noviembre del 2013. pp: 514-518.
- Samish, R. y Rehacek J. (1999). Pathogens and predators of tick and their potential in biological control. *Annual Review of Entomology*. 44:159-182.

Wraight S.P., M. E. Ramos. 2002. Application parameters affecting field efficacy of *Beauveria bassiana* foliar treatments against Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Biol Control* 23:164–178.