

Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Boophilus microplus* sensible y resistente a los organofosforados

Infectivity of *Metarhizium anisopliae* to susceptible and organophosphate-resistant *Boophilus microplus* strains

Manuel Fernández-Ruvalcaba^a, Elyes Zhioua^b, Zeferino García-Vázquez^a

RESUMEN

La infectividad del hongo entomopatogénico *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) fue probada en contra de una cepa de *Boophilus microplus* (Canestrini) sensible, y otra resistente a los organofosforados, por medio de un ensayo *in vitro* con hembras ingurgitadas de *B. microplus* recién desprendidas del bovino, utilizando la cepa ECS1 de *M. anisopliae*. El micromiceto *M. anisopliae* demostró ser altamente infectivo, tanto para la cepa sensible como para la resistente a los organofosforados a la concentración de 10^8 esporas/ml, resultando en 100 % de mortalidad para ambas cepas de *B. microplus* a los 20 días posteriores a la infección. La mortalidad de las garrapatas varió considerablemente de acuerdo a la concentración de las esporas, con valores CL_{50} de 10^3 esporas/ml para la cepa sensible, y 10^2 esporas/ml para la resistente. Los parámetros reproductivos de *B. microplus* fueron reducidos después de la infección, pero se observó sobre las dos cepas de garrapatas una variabilidad a las diferentes concentraciones de esporas. *Metarhizium anisopliae* mostró que puede ser considerado como un acaricida potencial para el control biológico de garrapatas *B. microplus* resistentes y susceptibles a los organofosforados.

PALABRAS CLAVE: *Boophilus microplus*, Control biológico, *Metarhizium anisopliae*, Resistencia organofosforados.

ABSTRACT

The infectivity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) was tested against one organophosphate (OP)-resistant and one susceptible *Boophilus microplus* (Canestrini) strains, by an *in vitro* assay with engorged *B. microplus* adult females recently detached from cattle, using the ECS1 strain of *M. anisopliae*. *M. anisopliae* micromycete showed to be highly infective against both the susceptible and the OP-resistant strains at the concentration of 10^8 spores/ml, resulting in 100% mortality for both *B. microplus* strains at 20 d postinfection. Tick mortality varied considerably depending on spore concentration, with LC_{50} values of 10^3 and 10^2 spores/ml for the susceptible and the OP-resistant strains, respectively. *B. microplus* reproductive parameters decreased after infection but variability existed between the two ticks at different spore concentrations. *M. anisopliae* can be considered as a potential acaricide for the biological control of both OP-resistant and susceptible strains of the *B. microplus* tick.

KEY WORDS: *Boophilus microplus*, Biological Control, *Metarhizium anisopliae*, Resistance, Organophosphates.

En México, el control de *B. microplus* se realiza por medio del uso de acaricidas químicos⁽¹⁾, los cuales por lo general tienen efectos adversos en el medio ambiente⁽²⁾. El uso continuo de los acaricidas ha propiciado el desarrollo del fenómeno de

The control of *Boophilus microplus* in Mexico is performed using chemical acaricides⁽¹⁾. Acaricides typically have adverse effects on the environment⁽²⁾. The continuous use of acaricides has promoted the development of resistance, a phenomenon which is

Recibido el 22 de agosto de 2003 y aceptado para su publicación el 25 de febrero de 2005.

^a Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Unidad de Artrópodos. AP 206, C.P. 62500, CIVAC, Morelos. fernandez.manuel@inifap.gob.mx. Correspondencia al primer autor.

^b Rhode Island University., Fisheries Animal and Veterinary Sciences Department.

resistencia, que actualmente tiene una amplia distribución en diferentes partes del mundo, incluyendo a México, por lo que la tendencia actual es reducir su uso por medio de programas de manejo integral de las garrapatas en el ganado bovino^(3,4).

La resistencia de las garrapatas *B. microplus* a los ixodicidas, representa un alto riesgo para la productividad de la ganadería mexicana⁽⁵⁾, además limita la exportación de ganado bovino a Estados Unidos, que es un país libre de este ectoparásito⁽⁶⁾. Por lo que es necesario estudiar nuevas alternativas para el control de la garrapata no basadas exclusivamente en el uso de acaricidas químicos.

Uno de los métodos alternativos para controlar a la garrapata *B. microplus* es el inmunológico, por medio de la utilización de una vacuna elaborada con metodología de biología molecular de una proteína de los intestinos de las garrapatas, sin embargo, los reportes del uso de la vacuna han mostrado una efectividad menor al de los acaricidas en el control de la garrapata^(7,8), por lo que se ha recomendado que la vacuna debe ser usada conjuntamente con un acaricida químico para obtener un control aceptable⁽⁹⁾.

Los estudios de control biológico de las garrapatas no son muy abundantes y menos aún concluyentes⁽¹⁰⁾, algunas leguminosas y pastos tropicales se han utilizado, mostrando tener un efecto anti-garrapata, pero su aplicabilidad para el control de poblaciones de garrapatas a nivel campo permanece por ser determinado⁽¹¹⁾. Otro método de control biológico, ha sido la utilización de hongos; en condiciones naturales se han aislado hongos entomopatógenos de garrapatas⁽¹⁰⁾ como *Metharizium anisopliae*, que se aisló de garrapatas *B. microplus* colectadas en el norte de México⁽¹²⁾. Esta especie de hongo es patógeno para diferentes especies de garrapatas incluyendo a *Ixodes scapularis* (Say)⁽¹⁰⁾, *Amblyomma variegatum* (F.)⁽¹³⁾, *B. microplus*⁽¹⁴⁾, y *B. annulatus* (Say)⁽¹⁵⁾.

Debido a la amplia distribución de la resistencia a los diferentes familias de acaricidas químicos utilizados en México, es importante conocer si existen alternativas de control de estas cepas resistentes, con el uso de hongos entomopatógenos

now widely distributed in different parts of the world, including Mexico. Therefore, the current trend is to replace the use of chemical acaricides by integrated tick management programs in cattle^(3,4).

Resistance of *B. microplus* to ixodicides represents a high risk factor for the productivity of the Mexican livestock industry⁽⁵⁾. In addition, it limits the export of cattle to the United States, as a *B. microplus*-free country⁽⁶⁾. Therefore, the need exists to study new tick control alternatives based not exclusively on the use of chemical acaricides.

An immunological method exists as an alternative for the control of *B. microplus*. This method is based on the use of a molecular biology developed vaccine that includes a tick intestinal protein. Nevertheless, the effectiveness of this vaccine in the control of the tick has shown to be lower than acaricides^(7,8), therefore the combination of the vaccine with a chemical acaricide has been recommended to obtain acceptable results⁽⁹⁾.

Studies on the biological control of ticks are scarce and inconclusive⁽¹⁰⁾. Some legumes and tropical grasses have shown anti-tick effects, but their application ability in the control of tick populations in the field is yet to be determined⁽¹¹⁾. One additional biological control has been the use of fungi. Entomopathogenic fungi have been isolated from ticks under natural conditions⁽¹⁰⁾. One example is *Metarhizium anisopliae*, that has been isolated from *B. microplus* ticks collected in Northern Mexico⁽¹²⁾. This particular fungal species is pathogenic for different tick species including *Ixodes scapularis* (Say)⁽¹⁰⁾, *Amblyomma variegatum* (F.)⁽¹³⁾, *B. microplus*⁽¹⁴⁾, and *B. annulatus* (Say)⁽¹⁵⁾.

Due to the wide distribution of acaricide resistance to the different classes of chemical used in Mexico, it is important to investigate other alternatives for the control of these acaricide resistant tick strains by the use of entomopathogenic fungi such as *M. anisopliae*. The purpose of this study was to evaluate the infectivity of *M. anisopliae* against two (one susceptible and one OP-resistant) strains of *B. microplus*.

The infectivity of *M. anisopliae* (ESCI-Bio-Blast strain) was tested using Drummond's method⁽¹⁶⁾.

como *M. anisopliae*. Por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar la infectividad de *M. anisopliae* en contra de dos cepas de *B. microplus*, susceptible y resistente a los organofosforados.

La infectividad de *M. anisopliae* (cepa ESCI-Bio-Blast) fue probada usando el método de Drummond⁽¹⁶⁾. Se utilizaron dos cepas de garrapatas de *B. microplus*, susceptible y resistente a organofosforados (OF); las colonias de garrapatas fueron reproducidas y mantenidas en bovinos en el CENID-PAVET del INIFAP en Jiutepec, Morelos. Para determinar la infectividad de *M. anisopliae*, se utilizaron garrapatas adultas ingurgitadas, que fueron expuestas a diferentes concentraciones de esporas. Se formaron siete grupos de 50 garrapatas de cada una de las dos cepas; las garrapatas fueron previamente pesadas en forma individual, cada grupo fue sumergido por 30 seg en una de las siete suspensiones de *M. anisopliae* en un rango de 10^2 a 10^8 esporas/ml, posteriormente las garrapatas se colocaron en toallas de papel. El grupo control de garrapatas fue sumergido en agua. Cada una de las garrapatas de los diferentes grupos fue depositada en viales individuales con tapón de malla, e incubados en cámara húmeda a 90 % de humedad relativa y a 25 °C. Las garrapatas fueron examinadas individualmente al microscopio para la detección de fungosis, y la mortalidad de garrapatas fue cuantificada a los días 10, 15 y 20 posteriores a la infección (PI). Las garrapatas fueron consideradas muertas, cuando no mostraron movimiento alguno al ser estimuladas, y presentaban micelios emergiendo a través de la cutícula.

A los 10 días PI la masa de huevos correspondiente a cada una de las garrapatas de los diferentes grupos del estudio fue separada y pesada en una balanza analítica. En cada una de las garrapatas se determinó el Índice de eficiencia reproductiva (IER = peso de la masa de huevos / peso de la hembra ingurgitada)⁽¹⁶⁾.

También se determinó el efecto de la infección fungal sobre la eclosión de larvas de *B. microplus*, sumergiendo 150 huevos por 30 seg en cada una de las siete suspensiones de esporas en el rango de 10^2 a 10^8 esporas/ml, y posteriormente secadas en toallas de papel. El grupo de huevos control fue

Two (susceptible and one OP-resistant) *B. microplus* strains were used. Tick colonies were reproduced and maintained on cattle at CENID-PAVET-INFAP facility in, Jiutepec, State of Morelos, Mexico. Engorged adult females ticks were used to determine the infectivity of *M. anisopliae*, using different spore concentrations. Seven (7) groups of 50 susceptible and 50 OP-resistant ticks were used. Individual ticks were previously weighted. Each group was immersed for 30 sec in one of the seven *M. anisopliae* suspensions (range: 10^2 - 10^8 spores/ml). Controls were immersed in water. All ticks were then dried by placing them on paper towels. Each tick in the different groups was placed in an individual mesh-capped vial. Ticks were incubated in a 90 % relative humidity, and 25 °C. Ticks were individually examined under the microscope for the detection of fungal infection. Tick mortality was analyzed at 10, 15, and 20 d postinfection (PI). Ticks were considered as dead by the absence of movement after stimulation, showing mycelia emerging from the cuticle.

Ten days PI the egg mass from each tick in the different treatment groups was collected and weighted, using an analytical scale. The reproductive efficiency index (REI = egg mass weight/engorged female weight)⁽¹⁶⁾ was determined for each individual tick.

The effect of fungal infection on *B. microplus* larval eclosion was also determined by immersing 150 eggs for 30 sec in each of the seven spore suspensions (range 10^2 to 10^8 spores/ml), followed by drying on paper towels. Control ticks were immersed in distilled water. Each concentration assay was replicated five times.

Lethal concentration 50% (LC₅₀) was estimated using the Reed and Muench method⁽¹⁷⁾. Survival of both tick strains was compared among the different spore concentrations using the χ^2 test. Strains were compared controlling spore concentrations, and results were analyzed by the Mantel-Haenszel method. At each concentration, the survival rate of adult females vs. time (10, 15, and 20 dais PI) was compared using the χ^2 test. REI was analyzed using a double ANOVA, comparing the two tick strains at different spore

sumergido en agua destilada. Los ensayos a cada concentración fueron replicados cinco veces.

La CL₅₀ fue calculada utilizando el método de Reed and Muench⁽¹⁷⁾. La sobrevivencia de ambas cepas fue comparada entre las diferentes concentraciones de esporas fungales usando un prueba de χ^2 . Las cepas fueron comparadas controlando la concentración de esporas y se analizaron los resultados por el método de Mantel-Haenszel. En cada concentración, se comparó la sobrevivencia de las hembras adultas en relación al tiempo en los días 10, 15 y 20 PI entre cepas usando la prueba χ^2 . El IER fue analizado utilizando un análisis de varianza doble, comparando las dos cepas de garrapatas a diferentes concentraciones de esporas; debido a la significancia de interacción encontrada los IER fueron comparados con cada concentración mediante la prueba t de Student⁽¹⁸⁾. Los porcentajes de huevos eclosionados de las dos cepas fueron analizados por medio de varianza triple, usando una transformación logarítmica (eclosión de la cepa de garrapata y la concentración de esporas), y la diferencia total entre las cepas fue determinada controlando la concentración de hongos usando la prueba de χ^2 de Mantel-Haenszel⁽¹⁸⁾.

M. anisopliae fue altamente infectivo para ambas cepas de *B. microplus* (Cuadro 1). El porcentaje relativo de sobrevivencia difirió entre las dos cepas de garrapatas a las diferentes concentraciones de esporas ($\chi^2=21.200$, $df=4$, $P=0.00029$). A los 20 días PI, la concentración de 10^7 esporas/ml produjo el 100 % de mortalidad en la cepa resistente a OF, mientras en la susceptible fue la concentración de 10^8 esporas/ml. La sobrevivencia entre cepas de garrapatas no se encontró asociada a las concentraciones de esporas cuando el efecto de la concentración de esporas fue controlada ($\chi^2=27.428$, $P=0.001$). Todas las garrapatas tratadas fueron cubiertas con micelios, pero no se observó crecimiento fungal en el grupo control. Los valores de CL₅₀ fueron de 10^2 esporas/ml para la cepa resistente a los organofosforados y de 10^3 esporas/ml para la cepa susceptible.

Las diferencias entre los valores del IER de la cepas resistente a OF y susceptible variaron a diferentes concentraciones de esporas (interacción

concentrations. Given the interaction significance found, REI's were compared with each spore concentration using Student's t test⁽¹⁸⁾. The percentage of hatched eggs from the two strains were analyzed using the 3-way ANOVA with the logarithmic transformation (tick strain eclosion rate, and spore concentration), and the total difference between strains was determined by controlling fungus concentrations, using the Mantel-Haenszel's χ^2 ⁽¹⁸⁾.

M. anisopliae was highly infective for both *B. microplus* strains (Table 1). The relative survival percentage differed between the two tick strains at the different spore concentrations ($\chi^2 = 21.200$, $df = 4$, $P = 0.00029$). At 20 d PI, the 10^7 spore/ml concentration showed 100 % mortality in the OP-resistant strain, while 100 % mortality occurred in the susceptible strain at the concentration of 10^8 spores/ml. When the effect of spore concentration was controlled (Mantel-Haenszel $\chi^2 = 27.428$, $P=0.001$) tick strain survival was not found to be spore concentration-associated. All treated ticks were covered with mycelia. No fungal growth was observed in the controls. LC₅₀ values were 10^2 spores/ml for the OP-resistant strain, and 10^3 spores/ml for the susceptible strain.

Cuadro 1. Porcentaje de sobrevivencia de la garrapata *B. microplus* de cepas sensible y resistente a los organofosforados infectados con *M. anisopliae* a 20 días postinfección

Table 1. Percentage of survival of one susceptible and one OP-resistant strains of adult female *Boophilus microplus* ticks 20 d after infection with the fungus *M. anisopliae*

Spores/ml	Strains		$\chi^2(df = 2)$	P
	OP-Resistant	Susceptible		
Control	100	100	0.0	1.000
10^2	46	94	6.547	0.038
10^3	46	38	5.265	0.072
10^4	2	24	19.388	0.001
10^5	0	12	7.827	0.020
10^6	4	18	4.853	0.088
10^7	0	2	7.946	0.019
10^8	0	0	-	-

N = 50 ticks for each concentration.

de dos vías de la concentración de esporas x cepa de garrapatas, $F=10.283$, $gl=7,784$, $P<0.0001$) (Cuadro 1). En la eclosión de huevos hubo diferencias estadísticamente significativas entre las dos cepas de garrapatas $\chi^2=253.15$, $P<0.001$).

La presencia de la fungosis observada en los grupos de garrapatas tratadas pero no en las controles, indica que *M. anisopliae* fue la causa de la mortalidad en las garrapatas tratadas en el laboratorio. A diferencia de los nemátodos entomopatogénicos, los cuales generalmente penetran a través del poro genital, partes bucales u otras aberturas de las hembras ingurgitadas⁽¹⁹⁾, *M. anisopliae* penetra directamente a través de la cutícula, usando mecanismos enzimáticos y mecánicos⁽²⁰⁾.

Los resultados de mortalidad muestran que *M. anisopliae* (cepa ESC1) es altamente infectivo para ambas cepas de *B. microplus* susceptible y resistente a los organofosforados en condiciones de laboratorio. La mortalidad de garrapatas observada en las dos cepas estuvo positivamente correlacionada a la concentración de esporas. Estos resultados concuerdan con previos estudios sobre la infectividad con este hongo para *B. microplus*^(15,21,22). Nuestros resultados apoyan estudios previos que muestran un aumento en la infectividad fungal para garrapatas *Ixodes scapularis* por encima de cierta concentración de esporas⁽¹⁰⁾, como los reportados en este estudio.

La cepa resistente a los OF fue altamente susceptible a la fungosis. Los acaricidas OF matan a las garrapatas inhibiendo a la enzima acetilcolinesterasa (ACh), aumentando los impulsos nerviosos a nivel de la sinapsis nerviosa debido a la acumulación de acetilcolina⁽²³⁾, matando a las garrapatas. Uno de los mecanismos de la resistencia de cepas de *B. microplus* resistentes a los OF es por medio del aumento de las enzimas estererasas⁽²⁴⁾ secuestrando al acaricida y permitiendo la acción de la ACh. Una de las principales recomendaciones para el control de cepas resistentes es la utilización de acaricidas con diferente mecanismo de acción al acaricida causante de la resistencia. El mecanismo de patogenicidad de los hongos entomopatogénicos en los invertebrados es totalmente diferente a los OF, los hongos matan a los invertebrados por la invasión del hemocele,

REI values between the OP-resistant and the susceptible strains varied depending on spore concentrations (2-way spore concentration x tick strain interaction, $F=10.283$, $gl=7,784$, $P<0.0001$) (Table 1). Statistical significant differences were observed in egg hatch rates between the two tick strains (Mantel-Haenszel $\chi^2=253.15$, $P<0.001$).

The presence of fungal infection in the treated groups and the absence of infection in the controls, show that *M. anisopliae* was actually the cause of mortality in the treated ticks in the laboratory. Different from entomopathogenic nematodes -which typically enter the tick through the genital pore, mouth parts, and other openings in the engorged females⁽¹⁹⁾, *M. anisopliae* penetrates directly through the cuticle using enzymatic mechanisms⁽²⁰⁾.

Mortality results showed that *M. anisopliae* (ESC1 strain) is highly infective for both susceptible and OP-resistant *B. microplus* strains under laboratory conditions. Mortality of both tick strains was positively correlated with spore concentrations. These results agree with previous studies on the infectivity of this fungi against *B. microplus*^(15,21,22). Our results support previous studies showing increased fungal infectivity in *Ixodes scapularis* ticks once certain spore concentration is exceeded⁽¹⁰⁾, similar to that reported herein.

The OP-resistant strain was highly susceptible to the fungal infection. OP-acaricides kill ticks by inhibiting the acetyl cholinesterase (ACh) enzyme, increasing the nervous impulse through the nervous synapse due to ACh accumulation⁽²³⁾, thus killing the tick. Another resistance mechanisms of OP-resistant *B. microplus* strains is by increasing esterase enzymes⁽²⁴⁾, sequestering the acaricide, thus allowing for the action of ACh. One major recommendation for the control of resistant tick strains is the use of acaricides with different mechanisms of action as compared with that of the acaricide that caused the resistance. The pathogenicity mechanism of entomopathogenic fungi on invertebrates is totally different from that of OP's. Fungi kill invertebrates by invading the

produciendo deficiencias nutricionales y daños patológicos de los tejidos internos de la garrapata⁽²⁵⁾. Por consiguiente la resistencia de *B. microplus* a los OF no afecta la susceptibilidad de esta cepa a la infección por hongos. Nuestros resultados mostraron una CL₅₀ de 10² y 10³ esporas/ml para las cepas resistente a OF y susceptible de *B. microplus*, respectivamente, aunque se ha reportado que en la infectividad de varios aislamientos de *M. anisopliae* la CL₅₀ es muy variable, la cepa E6S1 fue la más patogénica en contra de hembras ingurgitadas de *B. microplus* con una CL₅₀ de 10⁵ esporas/ml⁽²⁶⁾. También se reportó que *M. anisopliae* cepa CG-46 fue patogénica para *B. microplus* con una CL₅₀ de 1.4x10⁷ esporas/ml⁽²⁶⁾. La cepa Mada de *M. anisopliae* mostró ser infectiva para *I. scapularis* con una CL₅₀ de 10⁷ esporas/ml⁽¹⁰⁾.

Basados en el valor de la CL₅₀ se concluye que *M. anisopliae* cepa ESC1 es altamente infectiva para *B. microplus* comparada con otras cepas de hongos entomopatogénicos. Se ha demostrado que de cinco especies de hongos entomopatogénicos, *M. anisopliae* fue el más patogénico para hembras ingurgitadas de *B. microplus*⁽¹⁴⁾ y *R. Appendiculatus*, comparadas con el hongo *Beauveria bassiana*⁽¹³⁾. Ciertamente, la susceptibilidad de las garrapatas a los hongos entomopatogénicos varía para las diferentes especies y cepas, tanto de hongos como de garrapatas. Sin embargo, la infectividad de otras cepas de *M. anisopliae* y de otros géneros y especies de hongos ya aislados de origen nacional, necesita ser probada en contra de *B. microplus* y comparar con la cepa aquí estudiada, para encontrar las cepas de hongos más efectivas para el manejo del control de *B. microplus*.

La capacidad de producción de huevos de las hembras adultas ingurgitadas de ambas cepas de *B. microplus* varió con la CL₅₀ de esporas a la que fue expuesta. La capacidad de producción de huevos fue cinco veces más alta en las garrapatas control, que las observadas en las garrapatas tratadas a la concentración de 10⁸ esporas/ml; otros estudios han demostrado resultados similares^(15,27).

Es importante hacer notar, que a bajas concentraciones, los IER fueron más altos para la cepa resistente, mientras que a más altas concentraciones

hemocele. This results in nutritional deficiencies and pathological damage in internal tick tissues⁽²⁵⁾. Therefore, the resistance of *B. microplus* to OP's does not affect its susceptibility to fungal infection. Results showed LC₅₀ values of 10² and 10³ spores/ml for the OP-resistant and susceptible *B. microplus* strains, respectively. Nevertheless, highly variable infectivity/LC₅₀ of different *M. anisopliae* isolates has been reported. The E6S1 strain was the most pathogenic strain against *B. microplus* engorged adult female ticks with a LC₅₀ of 10⁵ spores/ml⁽²⁶⁾. It was also reported that the CG-46 strain of *M. anisopliae* was pathogenic for *B. microplus*, with a LC₅₀ of 1.4x10⁷ spores/ml⁽²⁶⁾. *M. anisopliae* Mada strain showed to be infective for *I. scapularis* with a LC₅₀ of 10⁷ spores/ml⁽¹⁰⁾.

Based on LC₅₀ values, it is concluded that the ESC1 strain of *M. anisopliae* is highly infective for *B. microplus* as compared with other entomopathogenic fungal strains. Out of five entomopathogenic fungus species, *M. anisopliae* showed to be the most pathogenic one for both engorged *B. microplus*⁽¹⁴⁾ and *R. appendiculatus*, adult females, when compared with the fungus *Beauveria bassiana*⁽¹³⁾. Indeed, the susceptibility of ticks to entomopathogenic fungi varies among different fungi/tick species and strains. Nevertheless, the infectivity of other *M. anisopliae* strains and other fungi genus/species previously isolated in Mexico need to be tested against *B. microplus* in comparison with the strain used in this study, in order to find the most effective fungi strains for the management and control of *B. microplus*.

The egg production ability of engorged adult females of our two *B. microplus* strains varied depending on the LC₅₀ of spores to which the ticks were exposed. Egg production was five times higher in the control ticks than in the ticks treated with the 10⁸-spore/ml concentration. Other studies have shown similar results^(15,27).

It is important to notice that higher REI's were observed in the resistant strain treated with lower fungi spore concentrations, while higher fungi spore concentrations tended to show higher REI values in the susceptible strain (Table 2). It would be

de esporas los IER tendieron a ser más altos en la cepa susceptible (Cuadro 2). Sería interesante ver si esta tendencia es consistente en la cepa *B. microplus* resistente a los OF vs la sensible al ser infectados con otras cepas de especies de hongos, especialmente porque se conoce que el efecto sobre la producción de huevos varía entre las especies de hongos entomopatogénicos^(15,26,27).

Los resultados mostraron que la eclosión de los huevos también varió de acuerdo a la concentración de esporas. La eclosión no difirió entre las cepas de garrapatas en los controles, pero fue significativamente más alta en la cepa resistente a los OF en cinco de siete concentraciones de esporas. Probablemente la producción de huevo aparentemente no sea afectada por diferentes cepas de hongos^(14,26).

Se ha reportado que la fecundidad difiere entre garrapatas infectadas por diferentes especies de hongos^(15,27), basados en la reducción de la capacidad de la producción de huevos y la eclosión observada en nuestro estudio, la fecundidad de *B. microplus* por hongos entomopatogénicos puede resultar en una gran reducción de la fecundidad, y por lo tanto en la disminución de las densidades poblacionales de *B. microplus*.

Se concluye que la actividad acaricida de *M. anisopliae* en contra de la cepa resistente y susceptible a los OF aquí probadas, sugieren que este hongo puede ser utilizado en programas de manejo integral de plaga dirigido en contra de las garrapatas *B. Microplus*; sin embargo, la efectividad de *M. anisopliae* en ganado infestado con garrapatas, debe de ser la siguiente fase de experimentación.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue parcialmente apoyado por el fondo SAGARPA-CONACYT-2002-CO1-1925.

LITERATURA CITADA

1. Ortíz EM. El uso de ixodicidas en México. En: Segundo Seminario Internacional de parasitología animal: Garrapatas y

Cuadro 2. Índice de eficiencia reproductiva de cepas de *B. microplus* susceptible y resistente a los organofosforados infectadas con *M. anisopliae* a 20 días postinfección

Table 2. Reproductive efficiency index (REI) of one susceptible and one OP-resistant adult female *Boophilus microplus* tick strains of 20 d after infection with the fungus *M. anisopliae*

Spores /ml	Strains		X ² (df = 2)	P
	Resistant (SD)	Susceptible (SD)		
Control	0.561 (0.009)	0.476 (0.012)	- 5.067	0.001
10 ²	0.529 (0.013)	0.461 (0.016)	- 2.848	0.006
10 ³	0.525 (0.012)	0.413 (0.019)	- 4. 553	0.001
10 ⁴	0.431 (0.019)	0.397 (0.019)	- 1.334	0.188
10 ⁵	0.304 (0.021)	0.342 (0.030)	1.026	0.310
10 ⁶	0.191 (0.025)	0.366 (0.023)	4.955	0.001
10 ⁷	0.236 (0.024)	0.257 (0.023)	0.645	0.522
10 ⁸	0.139 (0.017)	0.121 (0.017)	- 0.636	0.528

REI = (weight of egg mass)/(weight of engorged adult female tick).
SD= Standard deviation.
N= 50 ticks per spore concentration.

interesting to see whether the trend to be infected of this OP-resistant *B. microplus* strain vs the susceptible strain is consistent with other fungal species strains, particularly because variations in the effect on egg production among different entomopathogenic fungus strains has been reported^(15,26,27).

Results showed that egg hatchability also varied depending on fungi spore concentrations. Hatchability rates did not differ among the different tick strains and the controls, but it was significantly higher in the OP-resistant strain in 5 out of 7 spore concentrations. Egg production does not seem to be affected by the different fungus strains^(14,26).

Fertility differences among infected ticks by different fungus species have been reported ^(15,27). Based on the decreased egg production/hatchability observed in our study, the entomopathogenic fungi infection of *B. microplus* can result in important

- enfermedades que transmiten. Oaxtepec, Morelos, México. 1999:57-65.
2. Shelton D, Karns J. Coumaphos degradation in cattle dipping vats. *J Agri Food Chem* 1988;36:831-834.
 3. Solomon KR. Acaricide resistance in ticks. In: *Advances in veterinary science and comparative medicine*. Cornelius, Simpson SF editors. NY Academic Press; 1983:273-296.
 4. De Castro J. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet Parasitol* 1997;71:77-97.
 5. Santamaría VM, Soberanes CN, Ortiz AM, Osorio MJ. Analysis of the current situation by surveyed susceptibility of *Boophilus microplus* from 1993-1999. In: *Proceedings IV International seminar in animal parasitology*, Puerto Vallarta, Jalisco, México. 1999:103-112.
 6. Davey RB, George JE. Efficacy of coumaphos applied as a dip for control of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* on cattle. *J Econom Entomol* 1999;92:1384-1391.
 7. Redondo M, Fragoso H, Ortiz M, Montero C, Lona J, Medellín J, *et al.* Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with GavacTM and amidine treatments. *Exp Appl Acarol* 1999;23:841-849.
 8. Willadsen P, Jongenjan F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitol Today* 1999;15:258-262.
 9. Kemp HR, McKenna V. Strategies for tick control in a world of acaricide resistance. In: *Proceedings IV International seminar in animal parasitology*, Puerto Vallarta, Jalisco, México. 1999:1-10.
 10. Zhioua E. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to *Ixodes scapularis*. *J Parasitol* 1997;83:815-818.
 11. Fernández RM, Cruz VC, Solano VJ, García VZ. Anti-tick effects of *Stylosanthes humilis* and *S. hamata* on plots experimentally infested with *Boophilus microplus* larvae in Morelos, Mexico. *Exp Appl Acarol* 1999;23:171-175.
 12. Humber A. Collection of entomopathogenic fungal cultures. Publ. No. ARS-110. USDA. ARS, Beltsville, MD. 1992.
 13. Kaaya GP. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum* using entomogenous fungi. *Invert Pathol* 1996;67:15-20.
 14. Frazzon PI, Junior A, Masuda A, Schranck A. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 2000;94:117-125.
 15. Guindin G, Samish M. The susceptibility of *Boophilus annulatus* ticks to entomopathogenic fungi. *Biocon Sci Tecnol* 2001;11:111-118.
 16. Drummond RO, Whetstone TM. Oviposition of the gulf coast tick. *J Econom Entomol* 1999;63:1547-1551.
 17. Woolf C. Principles of biometry. Van Nostrand, Toronto, Canada. 1968:72-89.
 18. Wilkinson L. SYSTAT for the Macintosh, version 5.2 SYSTAT Evanston. 1992.
 19. Samish M, Glazer I. Entomopathogenic nematodes. *Trends Parasitol* 2001;17:368-371.

fertility reductions, hence in decreased *B. microplus* population density.

It is concluded that the acaricidal activity of *M. anisopliae* against the OP-resistant and the susceptible strains tested in this study, suggests that this fungus could be used in integrated pest management programs against the tick *B. microplus*. The effectiveness of *M. anisopliae* on tick-infested cattle should be the next experimental approach.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partly supported by the SAGARPA-CONACYT (Mexico's Secretariat of Agriculture, Livestock Production, Rural Development, Fishery and Food - The National Science and Technology Council) -2002-CO1-1925 project.

End of english version

-
20. St Leger RJ. Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by Deuteromycete fungal pathogens. In: *Parasites and pathogens of insects*. NY Academic Press; 1993:212-229.
 21. Correia AA, Fiorin CA, Monteiro C. Effect of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* in stable cattle. *J Invert Pathol* 1998;71:189-191.
 22. Bettencourt V. Trials to control South American ticks with entomopathogenic fungi. *Ann NY Acad Sci* 2000;916:555-558.
 23. O'Brien D. Insecticides, action and metabolism. NY Academic Press; 1967:115-127.
 24. Rosario CR. Resistance to acaricides and esterase activity variation in *Boophilus microplus* tick strains from Yucatán, México. In: *V International seminar of animal parasitology*. World situation of parasite resistance in veterinary medicine. Merida, Yucatan, Mexico. 2003:150-156.
 25. Kaaya HK, Tanada Y. *Insect Pathology*. NY Academic Press; 1993:56-68.
 26. Onofre B. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against *Boophilus microplus*. *Am J Vet Res* 2001;62:1478-1480.
 27. Kaaya GP, Hassan S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Exp Appl Acarol* 2000;24:913-926.