

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“EVALUACIÓN DE LA *Beauveria bassiana* EN EL CONTROL DE
Boophilus microplus IN VITRO EN EL DEPARTAMENTO
DE MADRE DE DIOS - 2015”

TESIS

Presentada por:

Bach. Laura Yeny Cahuari Parisaca

Para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

TACNA - PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**EVALUACIÓN DE LA *Beuveria bassiana* EN EL CONTROL DE
Boophilus microplus IN VITRO EN EL DEPARTAMENTO
DE MADRE DE DIOS - 2015**

Tesis sustentada y aprobada el 28 de diciembre del 2017; estando el jurado calificador integrado por:

PRESIDENTE :


Dr. Hugo Flores Aybar

SECRETARIO :


M.Sc. Luis Adolfo Ramos Mamani

VOCAL :


M.Sc. Teodora Julia Condori Silvestre

ASESOR :


M.Sc. Luis Alberto Barrios Moquillaza

DEDICATORIA

A Dios, por estar presente en todos los instantes de mi vida, por darme la fuerza para seguir adelante y llenarme de bendiciones.

A mi madre Felicitas Parisaca Q., por haberme inculcado la ética de trabajo, por ser mi guía, mi apoyo y ejemplo de honestidad, humildad y sacrificio.

A mi esposo Josué Palomino Q. por estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos.

A mi hijo Ignacio Palomino C. quien fue el motor y motivo que necesité para concluir mi trabajo de investigación.

A Tito Limache C. por el apoyo incondicional y desinteresado que siempre me brindo ya que con su apoyo pude ir mejorando mi investigación.

A Milagros Loayza Y. por ser siempre mi angelito, mejor amiga y acompañarme durante toda la carrera.

A mis hermanos quienes fueron un ejemplo en mi vida, quienes siempre estuvieron para velar por mí y mi familia.

A mis amigos por brindarme su comprensión, amistad y apoyo. Todos ustedes me han hecho crecer muchísimo como persona.

AGRADECIMIENTOS

A todos mis docentes de la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia por los conocimientos brindados y por haber formado en mí una profesional de éxito. A todos ellos muchas gracias por su constancia y apoyo.

Mi más profundo agradecimiento a todas las personas que me han apoyado, aconsejado y ayudado.

Al MSc. Luis Barrios , asesor de la tesis, más que un guía, fue un amigo, por su confianza, dirección, apoyo, por estar siempre pendiente en los avances, y ejercer la presión que necesité para concluir con esta investigación, considerando la distancia en la que se encuentra mi persona.

A mi equipo de trabajo, quienes con alegrías y conflictos fueron parte fundamental para la realización del presente trabajo.

A Dr. Roberto Lope H. por haberme brindado su apoyo y sabiduría durante la ejecución del presente trabajo.

A la empresa Camal Manu por haberme brindado el apoyo económico para concluir con la investigación.

Al Ing. Paul Pacheco por su apoyo incondicional durante toda la investigación, quien me demostró que es una persona comprometida con su palabra.

Al Ing. Edwin Palza por su apoyo en los análisis estadísticos del presente trabajo de investigación.

A los amigos (as) por brindarme su amistad y apoyo en el desarrollo de la presente tesis.

A las Instituciones que hicieron posible la culminación de una etapa más en mi formación académica-profesional: Camal Manu quienes pusieron la iniciativa de realizar dicha investigación, a la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Madre de Dios, FINCYT- innóvate Perú (fondo para la innovación Ciencia y Tecnología) 2015.

A mis padres, por su comprensión y apoyo incondicional que me brindaron en todo momento y respetando las decisiones de mi vida.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS.....	v
CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
1.1 Descripción del Problema.....	5
1.2 Formulación del problema.....	7
1.3 Justificación de la Investigación.....	7
1.4 Objetivos.....	8
1.4.1 Objetivo General.....	8
1.4.2 Objetivos Específicos.....	8

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	10
2.1 Antecedentes	10
2.2 Bases Teóricas	18
2.3 Base Conceptual	40
CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1 Material	43
3.1.1 Ubicación Geográfica y Temporal.....	43
3.1.2 Material de Estudio	43
3.1.3 Población y Muestra	44
3.1.4 Criterio de Inclusión y Exclusión	44
3.2 Método	45
3.3 Recolección de datos	46
3.4 Análisis de Datos	51
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	53
4.1 Concentración letal media (CL ₅₀) de <i>Beauveria bassiana</i> para el control de <i>Boophilus microplus</i> in vitro	53
4.2 Mortalidad de garrapatas in vitro producida por la <i>Beauveria bassiana</i>	55
4.3 Tiempo de acción de la <i>Beauveria bassiana</i> en el control de <i>Boophilus microplus</i> in vitro.....	58

4.4 Contrastación de la hipótesis	59
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN.....	62
CONCLUSIONES	66
RECOMENDACIONES.....	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXOS.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño del procedimiento de la investigación	46
Tabla 2. Concentración letal media de <i>Beauveria bassiana</i>	53
Tabla 3. Mortalidad de <i>Boophilus microplus</i> causada por la <i>Beauveria bassiana</i>	55
Tabla 4. Promedio de los días de acción de la <i>Beauveria bassiana</i>	58
Tabla 5. Análisis de varianza de diseño completamente al azar (DCA).....	59
Tabla 6. Prueba de significancia de Tuckey	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del procedimiento de las diluciones	48
Figura 2. Concentración letal media (CL ₅₀) de <i>Beauveria bassiana</i> para el control de <i>boophilus microplus</i>	54
Figura 3. Mortalidades de <i>boophilus microplus</i> por cada tratamiento	56
Figura 4. Tiempo de acción de la <i>beauveria bassiana</i> en el control de <i>boophilus microplus</i> in vitro.	58
Figura 5. Cuadro comparativo de diferencias entre tratamientos de Fisher	61

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Observación diaria de la mortalidad de <i>Boophilus microplus</i>	79
Anexo 2. Capacitación por el laboratorio control biológico SENASA – Lima	80
Anexo 3. Agar papa –dextrosa;Papa 125 g, en 250 ml de agua destilada, agregar dextrosa 9 g y agar agar 10g más 250 ml de agua destilada.	80
Anexo 4. Plaqueo de 10 a 15ml por PDA (cámara de flujo laminar).....	81
Anexo 5. Siembra del hongo <i>Beauveria bassiana</i> en agar PDA laboratorio de parasitología – C.P. M.V.Z – UNAMAD.....	81
Anexo 6. Los 9 tratamientos de <i>Beauveria bassiana</i> y un testigo con 4 repeticiones en un diseño completo al azar, con 400 unidades experimentales <i>Boophilus microplus</i>	82
Anexo 7. Esporulación a los 7 días post exposición.	82
Anexo 8. Prueba de calidad conteo de conidias en cámara Neu- bauer.....	83
Anexo 9. Prueba de calidad conteo de conidias en cámara Neu- bauer.....	83
Anexo 10. Prueba de calidad viabilidad de las esporas.....	84

Anexo 11. Prueba de calidad viabilidad de las esporas.....	84
Anexo 12. Ficha de conteo de conidias	85

RESUMEN

El estudio se realizó en la provincia de Tambopata (Madre de Dios, Perú), en el laboratorio de parasitología – Medicina Veterinaria y Zootecnia - Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, cuyo objetivo fue evaluar la efectividad de la *Beauveria bassiana* en el control del *Boophilus microplus* in vitro, para lo cual se colectaron 400 garrapatas adultas las cuales fueron sumergidas en los 10 tratamientos (9 tratamientos y un testigo), con 4 repeticiones usando placas Petri a condiciones óptimas in vitro ; a través de un diseño completamente al azar (DCA) se aplicaron $2,15 \times 10^9$; $6,00 \times 10^8$; $2,80 \times 10^8$; $2,30 \times 10^8$; $1,60 \times 10^8$; $9,0 \times 10^7$; $5,5 \times 10^7$; $4,5 \times 10^7$; $1,0 \times 10^7$ conidias/ml; se evaluó la dosis letal media, mortalidad y tiempo de acción de las garrapatas in vitro. El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico SPSS – 22; los resultados nos indican que la DL₅₀ fue la concentración de $2,30 \times 10^8$ conidias/ml de *Beauveria bassiana*, la mortalidad de *Boophilus microplus* fue de 34,5% y el tiempo de acción es de 13,9 días. Se concluye que la *Beauveria bassiana* es eficaz frente al *Boophilus microplus*.

Palabras clave: Control biológico, *Beauveria bassiana*, *Boophilus microplus*, conidias, dosis letal media, in vitro.

ABSTRACT

The study was carried out in the province of Tambopata (Madre de Dios, Peru), in the laboratory of parasitology - Veterinary Medicine and Animal Husbandry - National University of the Amazon of the Mother of God, whose objective was to evaluate the effectiveness of the *Beauveria bassiana* in the control of *Boophilus microplus* *in vitro*, for which 400 adult ticks were collected which were submerged in the 10 treatments (9 treatments and a witness), with 4 reps *using* Petri Dishes to optimum conditions *in vitro* through a completely randomized design (DCA) were $2,15 \times 10^9$; $6,00 \times 10^8$; $2,80 \times 10^8$; $2,30 \times 10^8$; $1,60 \times 10^8$; $9,0 \times 10^7$; $5,5 \times 10^7$; $4,5 \times 10^7$; $1,0 \times 10^7$ conidias/ml; assessed the dose Lethal, mortality and time of action of ticks *in vitro*. The data analysis was performed with the SPSS statistical program - 22; the results indicate that the DL_{50} was the concentration of $2,30 \times 10^8$ conidia/ml of *Beauveria bassiana*, the mortality of *Boophilus microplus* was 34,5 % and the time of action is of 13,9 days. It is concluded that the *Beauveria bassiana* is effective against the *Boophilus microplus*.

Keywords: Biological Control, *Beauveria bassiana*, conidia, *Boophilus microplus*, mean lethal dose, *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

Se considera que en el mundo las garrapatas son los parásitos externos que más pérdidas económicas ocasionan en la producción ganadera. En Australia y México se han hecho estimaciones de pérdidas de peso de hasta 50 kg/ animal/ año en zonas infectadas y una disminución de la producción de leche del 15%.

Las garrapatas y las enfermedades que transmiten, representan uno de los principales problemas que afectan a la ganadería bovina a nivel mundial (Polar et. al. 2005). Además los " cueros picados" tienen precios 25% menores a los cueros sanos (Cetrá, 2001).

Las garrapatas del ganado vacuno *Boophilus microplus* (Broglia et. al. 2012) son el principal problema veterinario en las regiones tropicales y subtropicales (Rodríguez et. al., 1995).

Son un grupo de parásitos externos, artrópodos hematófagos causantes de enfermedades parasitarias (Babesiosis o piroplasmosis y Anaplasmosis) que afecta a los bovinos en todas sus edades, causándoles una anemia perjudicial para la producción de leche y carne, irritación y malestar (Drugueri, 2004).

Se calcula que cada garrapata adulta succiona de 2 a 3 ml de sangre durante su vida parasitaria (con 50 garrapatas adultas que se desprenden por día, el bovino pierde 1,5 litros de sangre por mes) (Cetrá, 2001).

El principal método de control de las garrapatas es la aplicación de acaricidas químicos, sin embargo, el uso frecuente e indiscriminado de estos productos puede favorecer el desarrollo de cepas de garrapatas resistentes a los acaricidas y tener efectos secundarios sobre el medio ambiente así como influir en la presencia de residuos químicos en los alimentos de origen animal (Fernández et. al., 2008).

Los métodos de control químico traen consigo peligros para la salud de las personas, de los animales y del ambiente, lo que abre paso a métodos alternativos de control.

La necesidad de encontrar nuevas opciones y alternativas de lucha, que eliminen el carácter tóxico de las terapias tradicionales y permitan un uso racional de los acaricidas químicos para lograr menos daños directos y colaterales a la producción y el medio ambiente (Parra et. al., 1999), ha permitido investigar otros métodos de control como el de los hongos entomopatógenos u otros medios biológicos.

Por otro lado el control biológico de *Boophilus microplus*, mediante el uso de hongos entomopatógenos, ha sido sugerido por diversos investigadores como una de las alternativas con mayor futuro para el control de las garrapatas en los bovinos (Fernández y Bittencourt, 2008).

Dentro de éstos el hongo *Beauveria bassiana* ha mostrado mayor patogenicidad contra *Boophilus microplus* bajo condiciones de laboratorio y el campo (Ojeda, 2007).

Beauveria bassiana es un controlador biológico efectivo de muchas plagas, entre ellas las garrapatas y no tiene los problemas asociados con el uso de productos químicos.

Se estudió la susceptibilidad de garrapatas al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio. Las pruebas de laboratorio se llevaron a cabo con garrapatas adultas no tratadas con acaricidas obtenidas de animales infectados; el objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad, CL₅₀, determinar el tiempo de acción de la *Beauveria bassiana* in vitro y la mortalidad del *Boophilus microplus*.

Para tales objetivos se usó diseño completo al azar donde se plantearon 9 concentraciones, un testigo y 4 repeticiones por cada tratamiento para luego ser diluidas, luego se procedió a inocular las garrapatas y ser colocadas en placas Petri y ser expuestas a condiciones

favorables para la *Beauveria bassiana*, para después ser evaluadas durante 21 días y así también poder evaluar el tiempo de acción de la misma.

Para determinar los resultados se usó el programa SPSS y elaboración de distintas tablas, dando como resultado una Mortalidad Corregida (MC) de 138, se elaboró una tabla sobre los días de acción de la *Beauveria bassiana* usando programas SPSS-22 teniendo como resultado un promedio de 13,9 días de acción. El coeficiente de variabilidad nos muestra un valor bajo (46,89 %), hecho que nos demuestra que los datos están dentro de la distribución normal, y que podemos continuar con los análisis, y así se llevaron los resultados a la prueba de Fisher y Tuckey.

Los beneficiarios son los pequeños, medianos y grandes productores de bovinos en el sistema extensivo en el departamento de Madre de Dios a largo plazo.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

1.1 Descripción del Problema.

Las garrapatas y las enfermedades que transmiten, representan uno de los principales problemas que afectan a la ganadería bovina a nivel mundial (Polar et. al., 2005). Además la disminución de la calidad de los cueros. Estos " cueros picados" tienen precios 25% menores a los cueros sanos (Cetrá, 2001).

Se considera que en el mundo las garrapatas son los parásitos externos que más pérdidas económicas ocasionan en la producción ganadera por la disminución de la producción de bovinos infectados. En Australia y México se han hecho estimaciones de pérdidas de peso de hasta 50 kg/ animal/ año en zonas infectadas y una disminución de la producción de leche del 15%.

De importantes pérdidas de sangre: Se calcula que cada garrapata adulta succiona de 2 a 3 ml de sangre durante su vida parasitaria (con 50

garrapatas adultas que se desprenden por día, el bovino pierde 1,5 litros de sangre por mes) (Cetrá, 2001).

Son un grupo de parásitos externos, artrópodos hematófagos causantes de enfermedades parasitarias (Babesiosis o piroplasmosis y Anaplasmosis) que afecta a los bovinos en todas sus edades, causándoles una anemia perjudicial para la producción de leche y carne, irritación y malestar (Drugueri, 2004).

El principal método de control de las garrapatas es la aplicación de acaricidas químicos, sin embargo, el uso frecuente e indiscriminado de estos productos puede favorecer el desarrollo de cepas de garrapatas resistentes a los acaricidas y tener efectos secundarios sobre el medio ambiente; así como influir en la presencia de residuos químicos en los alimentos de origen animal (Fernández y Bittencourt, 2008).

Los métodos de control químico traen consigo peligros para la salud de las personas, de los animales y del ambiente, lo que abre paso a métodos alternativos de control.

Por otro lado el control biológico de *Boophilus microplus*, mediante el uso de hongos entomopatógenos, ha sido sugerido por diversos investigadores como una de las alternativas con mayor futuro para el control de las garrapatas en los bovinos (Fernández y Bittencourt, 2008).

Dentro de éstos el hongo *Beauveria bassiana* ha mostrado mayor patogenicidad contra *Boophilus microplus* bajo condiciones de laboratorio y el campo (Ojeda, 2007).

Beauveria bassiana es un controlador biológico efectivo de muchas plagas, entre ellas las garrapatas y no tiene los problemas asociados con el uso de productos químicos.

El presente estudio evaluó la susceptibilidad de garrapatas al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio.

1.2 Formulación del problema.

¿Cuál será el efecto de hongos entomopatógenos (*Beauveria Bassiana*) en ectoparásitos (*Boophilus microplus*) in vitro en el departamento de Madre de Dios?

1.3 Justificación de la Investigación.

El presente trabajo de investigación es importante porque nos brindará información sobre la concentración letal media adecuada para controlar el problema de ectoparásitos *Boophilus microplus* in vitro a nivel de trópico, además nos dará el tiempo de acción de la *Beauveria bassiana* sobre el control de *Boophilus microplus*.

Los beneficiarios son los productores de bovinos en el sistema extensivo en el departamento de Madre de Dios.

El presente trabajo formará parte del banco de conocimientos científicos en las UNJBG, UNAMAD y revistas científicas contribuyendo a investigaciones futuras.

Finalmente los resultados de la investigación servirán como un medio de consulta para que profesionales del área puedan aplicar dichos resultados a nivel de campo, así mismo colaborar con la protección del ganado, del medio ambiente y con la salud pública.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

- Evaluar la efectividad de la *Beauveria bassiana* en el control del *Boophilus microplus* in vitro.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Estimar la concentración letal media (CL₅₀) de *Beauveria bassiana* para el control de *Boophilus microplus* in vitro.

- Determinar la mortalidad de garrapatas producida por la *Beauveria bassiana* in vitro.
- Determinar el tiempo de acción de la *Beauveria bassiana* en el control *Boophilus microplus* in vitro.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Se procedió a buscar información de revistas, tesis, libros, no habiéndose encontrado publicaciones sobre el tema en la región sur del país, sin embargo se encontraron los siguientes trabajos:

“Control biológico de la ectoparasitosis en bovinos por *Boophilus microplus* mediante el uso de hongos entomopatógenos en la irrigación de Majes- Arequipa, 1999” realizado en Perú. El objetivo fue evaluar el uso de 3 hongos entomopatógenos, *Verticillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, para el control de *Boophilus microplus*. La fase experimental del laboratorio consistió en la producción de los tres hongos entomopatógenos citados. En medios de cultivos artificiales (PDA), con posterior propagación en substratos naturales (arroz). Se obtuvieron soluciones esporogénicas (6×10^8 conidias/ml), las cuales fueron asperjadas en garrapatas *Boophilus microplus* bajo condiciones de laboratorio, obteniéndose tasas de mortalidad de 82 %,

57% y 52% para *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii*, respectivamente. Para la experimentación del campo, se seleccionaron previamente 60 vacunos, procedentes de 5 establos de la Irrigación Majes, los cuales se determinó mediante inspección visual que estaban infestados por *Boophilus microplus*. Para la evaluación del efecto garrapaticida de los biopreparados a base de hongos entomopatógenos, los vacunos seleccionados fueron distribuidos en cuatro grupos de tratamiento de 5 animales cada uno y con 3 repeticiones, recibiendo aspersiones semanales de estos biopreparados durante un mes (T1=*Verticillium lecanii*; T2=*Beauveria bassiana*; T3=*Metarhizium anisopliae*, y T4= grupo control).. Bajo condiciones de campo, el hongo entomopatógeno con mayor efecto letal sobre el estadio parasítico de las garrapatas fue *Metarhizium anisopliae* con un 83% de mortalidad como promedio de sus tres repeticiones, luego el tratamiento con *Beauveria bassiana* tuvo un 57% de mortalidad y el *Verticillium lecanii* 52% de mortalidad.; asimismo, aparentemente se comprobó la inocuidad de los tres hongos entomopatógenos para los vacunos (Mayta, 2000).

“Evaluación de la eficiencia del control de garrapatas (*Boophilus microplus*) con tres frecuencias de aplicación de bazam (*Beauveria bassiana*)” realizado en Honduras. Evaluaron la susceptibilidad de garrapatas al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en condiciones

de laboratorio. Las pruebas de laboratorio se llevaron a cabo con larvas obtenidas de la ovoposición de parásitos adultos recolectados de animales infestados. Evaluaron la susceptibilidad de *Boophilus microplus* a tres diluciones de conidias puras de *Beauveria bassiana*, Las concentraciones evaluadas fueron: Alta, $2,5 \times 10^8$ conidias/mL; Media, $1,25 \times 10^8$ conidias/mL; Baja, $6,25 \times 10^7$ conidias/mL. y se estimó la concentración letal media (CL50) de BAZAM® Los tres tratamientos fueron diferentes ($P < 0,05$) del testigo ; los resultados fueron para Bb- $6,25 \times 10^7$ con/ml con una mortalidad de 100% y esporulación 47,5%; Bb- $6,25 \times 10^8$ con/ml con una mortalidad de 100% y esporulación de 50% y Bb- $2,5 \times 10^8$ con/ml con una mortalidad de 90% y esporulación de 40% (Fernández, 2006).

“Efecto de diferentes medios biológicos en el control de las garrapatas de bovinos” realizado en España. Se evaluaron diferentes medios biológicos sobre las fases del ciclo de vida de las garrapatas a nivel de laboratorio. En esta fase se evaluaron tres medios biológicos: *Bacillus turhingiensis*, *Verticillium lecanii* y *Beauveria bassiana*, a una concentración de 10^9 esporas/ml, considerando las recomendaciones establecidas por el Instituto Nacional de Sanidad Vegetal para estos medios, mediante un diseño experimental totalmente aleatorizado, con cinco réplicas para cada uno. En cada medio biológico se evaluó su

efecto sobre las diferentes fases del ciclo de las garrapatas (huevos, larvas y adultos). Además se utilizó un tratamiento control basado en la aplicación de agua destilada; de ellos, dos pasaron a la segunda fase. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS 10.0. Los mayores porcentajes de mortalidad en adultos, a nivel de laboratorio, se correspondieron a la aplicación de los medios biológicos *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii*, con valores que superaron el 90%, pasado los 21 días de aplicación, los cuales difirieron significativamente ($P < 0,05$) de *B. turhingiensis*. La aplicación de los medios biológicos tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de postura ($P < 0,05$), el peso de los huevos por postura ($P < 0,01$), así como sobre la eclosión y la viabilidad de las larvas ($P < 0,05$), siempre con los mejores resultados para la aplicación de *Beauveria bassiana* (Pérez, 2007).

“Control biológico de *Rhicephalus (Boophilus) microplus* con hongos entomopatógenos”, realizado en México. La finalidad del estudio fue observar la capacidad patógena de dos cepas de *Metarhizium anisopliae* a dosis de 1×10^8 conidias/ml y $1,3 \times 10^{12}$ conidias/ml, y de una cepa de *Beauveria bassiana* a una dosis de $1,3 \times 10^{12}$ conidias/ml en unidades de producción en bovinos de doble propósito, en los municipios de Emiliano Zapata y la Cuenca Lechera de Catazajá, directamente en campo. Se presentó una respuesta binomial negativa de mayor porcentaje

de patogenicidad en las dosis $1,3 \times 10^{12}$ de conidias/ml de *Beauveria bassiana* con 76,66% a los 37,3 días de haber sido inoculada la garrapata, en contraste con las dos cepas de *Metarhizium anisopliae*, que mostraron una patogenicidad de 47,71% a los 10 días con la dosis 1×10^8 conidias/ml y de 37,75% a los 44,5 días con la dosis $1,3 \times 10^{12}$ conidias/ml. Se presentó interacción entre tratamiento y tiempo. Por tanto, se concluye que el uso de los hongos entomopatógenos es una alternativa para el control de garrapatas adultas en el sureste de México. (Pérez León, 2007) asegura que la mortalidad ocasionada a *Boophilus microplus* por *Beauveria bassiana* (59,19 %) en condiciones de laboratorio es el resultado de la cepa comercial de *Beauveria bassiana* $1,3 \times 10^{12}$ conidias/ml (Bautista, 2007)

“Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la inhibición de ovoposición, eclosión y potencial reproductivo en una cepa triple resistente de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini) (Acari: Ixodidae)*”, realizado en México. En el presente trabajo se evaluaron los efectos de cuatro cepas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, denominadas Bb-M13J15, Bb-M14J18, Bb-M21J7, Bb-M5J5, y de nueve de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin, denominadas Ma-M12J15, Ma-M6J19, Ma-M5J15, Ma-M18J18, Ma-M14J9, Ma-M1J15, Ma-M14J13,

Ma-M4J9 y Ma-M5J18, ambas especies de hongos de origen mexicano. La cepa comercial MaM26J1 fue usada como testigo positivo. Se utilizó la técnica de inmersión de hembras repletas de Drummond durante 60 segundos con cinco concentraciones usando el valor 0,5 como factor de dilución. Se determinó la concentración de inhibición de ovoposición (CIO), de la eclosión (CIE) y del potencial reproductivo (CIPR). Cuatro cepas de *Metarhizium anisopliae* Ma-M14J9, Ma-M26J1, Ma- M12J15, Ma- M1J15 y una de *Beauveria bassiana* Bb-M5J5 resultaron altamente infectivas para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* triple resistente alcanzando un control sobre el potencial reproductivo de 90 % en concentraciones menores a 37×10^6 de conidios/ml (Fernández et. al., 2010).

“Evaluación de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*(Canestrini,1887)(Acari:Ixodidae)”, realizado en Chile. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar diferentes colonias aisladas en concentraciones de *Metarhizium anisopliae* y de *Beauveria bassiana* para el control de la garrapata común del vacuno. La multiplicación de conidios fue realizada a partir de hongos inoculados en arroz pre cocido estéril. Los ensayos de inmersión fueron realizados sobre garrapatas adultas ingurgitadas o teleoginas colectadas de bovinos no tratados con

acaricidas. El diseño experimental fue completamente al azar con 20 tratamientos y cinco repeticiones, siendo cada una de estas constituidas por cinco hembras. La mortalidad de las teleoginas ocasionada por *Metarhizium anisopliae* fue variable entre 92 a 100 % y para *Beauveria bassiana* este parámetro varió entre 44 a 100 %, observándose que la mortalidad fue superior en las concentraciones de 10^8 y 10^9 conidias mL^{-1} , destacándose las cepas de *Beauveria bassiana* (Fitossan 1) y *Metarhizium anisopliae* (PL 43) (ambos 10^9 conidias mL^{-1}) y (Fitossan 4) (10^8 conidias mL^{-1}), que a los 14 días de tratamiento habían eliminado el 100, 92 y 88 % de las teleoginas, respectivamente. En general, no existió diferencia en relación al peso de los huevos provenientes de hembras tratadas con el mismo aislado en las concentraciones de 10^7 , 10^8 y 10^9 conidia mL^{-1} , aunque se obtuvieron pesos inferiores para las cepas de *Metarhizium anisopliae*. La eficiencia del control varió de 0% (control) a 31,30 % (*Metarhizium anisopliae* Fitossan 4, 10^8 conidias mL^{-1}) (Broglio et. al., 2012).

“control biológico con hongos entomopatógenos: una estrategia de aula para promover el cuidado del medio ambiente”, realizado en Colombia .El objetivo principal de este trabajo fue elaborar una propuesta didáctica para evaluar los efectos potenciales de las soluciones de los hongos en tres concentraciones (1; 2 y 3 g / L) en hembras adultas de

garrapatas recolectadas de vacas. Se realizó aplicación tópica del hongo por aspersión sobre las garrapatas y se observó su comportamiento durante cuatro semanas. Los principales resultados fueron: En primer lugar se observó pérdida de humedad (sequedad), luego necrosis (cambio a color negro) y, finalmente, el desarrollo de los conidios blancos sobre la superficie de las garrapatas; además se observaron ácaros muertos en diferentes porcentajes, los cuales no presentaron correlación dosis respuesta. Este diseño experimental sencillo mostró el uso potencial de este producto en el control de plagas de ganado doméstico mostrando mortalidad desde un 40 % hasta un 100 % en su dosis más alta (Merchan, 2015).

“Eficiencia in vitro de hongos entomopatógenos y productos químicos sobre *Rhipicephalus microplus* ”, realizado en Colombia, con el fin de evaluar la eficiencia in vitro de *Cordyceps bassiana* (Cepa BbF2011), *Metharizium anisopliae* (Cepa MAF1309) y productos químicos en la fase adulta de *Rhipicephalus microplus*; se colectaron garrapatas hembras pletóricas de bovinos, se empleó la técnica de inmersión de Drummond utilizando una dilución de 1×10^8 esporas/ml para los hongos, un organofosforado (OF) al 97 %, un piretroide (PS) al 15 % y amitraz (AM) al 20,8%. Las garrapatas tratadas con *Cordyceps bassiana* alcanzaron el 100% de mortalidad el día 10 post-tratamiento (PT), seguida

de *Metarhizium anisopliae* y OF los cuales llegaron al 100% de mortalidad los días 11 y 14, respectivamente. Los tratamientos con AM, PS y control no alcanzaron el 100 % de la mortalidad. El efecto de *Cordyceps bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la fase adulta de garrapatas genera nuevas alternativas de control de *Rhipicephalus microplus* (Sepúlveda et. al., 2017).

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 Morfología de *Boophilus microplus*

Morfológicamente, las especies de la familia Ixodidae se caracteriza por poseer capítulo siempre en posición terminal (visible dorsalmente) y escudo dorsal en todos los estados biológicos. El dimorfismo sexual es acentuado (escudo pequeño y corto en hembras, larvas y ninfas, no sobrepasando la región media del cuerpo; mientras que en machos el escudo es largo y se extiende hasta la margen posterior). En las hembras se observan áreas porosas; hipostoma denticulado en la mayoría de los géneros, en muy pocos casos con granulaciones. El último artículo o segmento del palpo de la pata IV está en posición ventral, situado en una cavidad en la extremidad distal del artículo III. Las placas espiriculares están situadas posteriormente a la pata IV (García, 2011).

Estos ácaros presentan dos partes diferentes visibles, el tronco globoso y extremidades articuladas. La parte anterior, no es una cabeza propiamente dicha, ya que el cuerpo de la garrapata es una sola masa, tiene un conjunto de pies móviles que forman el gnathosoma y una base que mide 4 mm de largo por 0,9 mm de ancho, por encima de este, se observan dos depresiones llamadas áreas porosas de las cuales sobresalen dos ganchos denominados quelíceros que ayudan a romper la piel del hospedero (Bazán, 2002).

Por debajo de los quelíceros que aparecen en número par en forma de hoz y los ocelos a los lados, se observa una prolongación de la base de gnathosoma llamado hipostoma, presenta una fórmula dentaria de 3/3, 4/4 que facilita la acción de perforar la piel del hospedero y además participa como órgano de fijación, consta de un par de pedipalpos conformado por cuatro segmentos. Cada pedipalpo desempeña dos funciones: una ayuda a proteger las partes suaves de la boca, la otra funciona como órgano sensorial (Bazán, 2002).

Enseguida aparecen las extremidades con seis artejos: coxa, trocánter, fémur, tibia, pretarso y tarso. Es necesario señalar que los adultos y las ninfas poseen estigmas y se sitúan en el último par de coxas, mientras que las larvas carecen de ellas, además presentan dimorfismo sexual,

siendo el macho de menor tamaño que la hembra. Cada extremidad mide en promedio de 10 a 12 mm en las hembras y de 3 a 4 mm en los machos. La parte posterior del acaro se denomina propodosoma (Bazán, 2002).

El sistema de protección o cutícula posee tres capas: epicutícula, mesocutícula y endocutícula, en ella se aprecian poros, canales o espiráculos. La primera capa contiene; lípidos, sustancias cementantes, cuticulina y polyfenol que cumplen la alta función de protección al desecarse. Este sistema de protección, tiene la particularidad de sufrir elongaciones de hasta 20 veces su tamaño original cuando esta replete de sangre (Bazán, 2002).

2.2.2 La Garrapata *Boophilus microplus* y su ciclo biológico.

2.2.2.1 Garrapatas

La vida de la garrapata se divide en dos fases: Una vida parasitaria en el hospedero y otra forma de vida libre en el medio ambiente (Embrapa, 2005).

La fase de vida libre se inicia después de la caída de las teleóginas congestionadas con la pre-postura, que tiene una duración mediados a tres días, y puede extenderse a más de 90, que pasa a partir de entonces

a la fase de ovipostura que dura alrededor de 17 a 90 días y a continuación, la fase de la eclosión, que son necesarios durante cinco a diez días y puede sin embargo durar hasta más de 100. Después del nacimiento de las neolarvas, es necesario un período de cuatro a 20 días, poco después las larvas suben al pasto ascendiendo hasta el extremo de las hojas, donde se ubican preferentemente en la cara sombreada para evitar la luz solar (Embrapa, 2005).

Por lo tanto, la vida libre de la garrapata de Bovinos da la vuelta 28 a 51 días y pueden extenderse a más de 300 días. Además de esto las larvas pueden vivir más de seis meses sin comida. En buenas condiciones de temperatura y humedad, la caída / postura / brote tiene duración de 1 mes.

En los meses fríos y lluviosos, el desarrollo de los huevos es más rápido. En períodos seco y frío, para desarrollar demora hasta tres meses más, a menudo lentamente (Domínguez et. al., 2010).

La fase de vida libre sufre interferencias climáticas, con lo que los cambios en sus períodos, que se ven particularmente afectados por la humedad y temperatura en las etapas de la vida parasitaria es prácticamente constante en todas las regiones. En este entorno hay

varios factores (clima, vegetación, densidad animal, raza, etc.) que influyen en la supervivencia de garrapatas en cada segmento de su ciclo.

La etapa de la vida parasitaria comienza cuando la larva infectante se instala, las garrapatas recién nacidas (larvas) se suelen encontrar adheridas a las zonas más finas de la epidermis tales como la cara interna de los muslos, los flancos y las patas traseras. También se las puede observar en el abdomen y el pecho. Después de alimentarse las larvas sufren dos mudas y se convierten en ninfas y posteriormente en garrapatas adultas. Cada estadio de desarrollo (larva, ninfa y adulta) se alimenta una sola vez, pero la alimentación dura varios días. Las garrapatas macho adultas maduran sexualmente después de la alimentación y se aparean con hembras que están alimentándose. Una garrapata hembra adulta que se ha alimentado y apareado se separa de su huésped y deposita una gran cantidad de huevos en el medio ambiente. Por lo general, colocan los huevos en grietas o detritus, o debajo de las piedras. La garrapata hembra muere después de la oviposición. Las garrapatas en el subgénero *Boophilus microplus* pueden completar su ciclo de vida en un plazo de 3 a 4 semanas; esta característica puede causar una gran carga de garrapatas en los animales (IICAB (INSTITUTE FOR INTERNATIONAL COOPERATION IN ANIMAL BIOLOGICS), 2007)

2.2.3 Principales métodos de control de las garrapatas en los sistemas ganaderos

Se clasifican en métodos químicos, biológicos, genéticos y naturales (FAO, 2003).

2.2.3.1 Control químico

Los principios activos más usados en la lucha contra las garrapatas han sido: organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas y piretroides sintéticos (Guerra *et al.*, 2005).

Compuestos clorinados: Son estimulantes del sistema nervioso central (SNC), por lo que producen manifestaciones neuromusculares (Encinas *et. al.*, 1999).

Organofosforados: Son lipofílicos, se absorben a través de la piel y se acumulan en el tejido adiposo donde son liberados lentamente a la sangre y otros líquidos fisiológicos (leche), por acumulación pueden dar origen a un estado de envenenamiento crónico, motivo por lo que su uso es restringido (Álvarez *et. al.*, 2003).

Los medicamentos de mayor uso en este grupo son: Azinfosmetilo, Carbofenación, Clorfenvinfós, Clorpirifós, Coumafós, Diazinón, Diclorvós,

Dioxatión, Feniltroton, Fentiión, Fosmet, Foxim, Malatión, Paratión, Tiofós y Triclorfón (De Sousa y Furlong, 2005).

Carbamatos: inhiben la colinesterasa. Los principios activos más conocidos son: Carbaril, Carbofurán, Metonilo y Propoxur (Encinas et. al., 1999).

Piretroides: Provocan un bloqueo de la actividad motriz, los fármacos más frecuentes en este grupo se hallan: Alletrina, Cihalotrina, Cipermetrina, Deltametrina, Fenvalerato, Fenotrín, Flucitrinato, Flumetrina, Permetrina y Resmetrina. Estos compuestos tienen efectos residuales importantes (Álvarez et. al., 2003).

Formamidinas: Ocasionan la muerte del ectoparásito por inhibición de la monoaminoxidasa, sus dianas más importantes son los receptores de la optopamina. El producto de mayor uso es el Amitraz (Pereira, 2006).

La Ivermectina y otros derivados de la Ivermectina, como moxidectin y doramectina, están siendo desarrollados con buenas perspectivas para su uso como garrapaticida (Rodríguez et. al., 2002).

El Closantel (5 mg/kg) también se ha empleado como garrapaticida y demostró una eficaz protección sobre formas inmaduras de *Boophilus*

microplus y la reducción en la eclosión de los huevos de hembras tratadas. Además, ofrece buena protección vía SC (Encinas et. al. 1999).

El principal problema del uso de las sustancias químicas contra las garrapatas es la aparición de resistencia a los acaricidas y la reaparición del parásito en zonas ya limpias, situación que dificulta las campañas de lucha (De Sousa y Furlong, 2005).

La resistencia desarrollada por garrapatas se ha manifestado frente a casi todos los grupos químicos utilizados en su control; esto ha ocurrido, preferentemente, en áreas donde la utilización de acaricidas ha sido más sistemática (Betancourt et. al., 2004).

2.2.3.2 Control biológico

El desarrollo de vacunas contra la garrapata *Boophilus microplus* fue reportado por primera vez en Australia donde la proteína BM86, aislada del intestino de la garrapata, fue recombinada en *Escherichia coli* y llevada a escala mundial bajo los nombres de Tick Gard ® (Rand et. al., 1989).

Posteriormente investigadores cubanos, con el empleo, básicamente, de la misma tecnología, pero con la combinación de la proteína en la levadura *Pichia pastoris*, produjeron una vacuna denominada Gavac ®

(CIGB, Cuba), la cual tiene registro para su aplicación en varios países de Latinoamérica como Colombia, Bolivia, Brasil, México (Valdés et. al., 2005).

Otra formulación que se ha venido desarrollando es la TickVac MK, la cual emplea un antígeno crudo obtenido de la totalidad de la proteína natural de larvas de *Boophilus microplus* (Betancourt et. al., 2004).

En el ecosistema existen, además, reguladores biológicos de garrapatas que están en el grupo de los entomopatógenos (Samsinakova et al., 1974) encontraron una hembra de *Ixodes ricinus* con micelios de *Beauveria tenella* cerca de la boca y en la región ventral.

(Romaña et. al., 1987), probaron 14 aislamientos de hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana*, *Beauveria brongiarthii*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi* y *Paecilomyces fumosoroseus*), para controlar larvas del primer estadio de *Rhodnius prolexus* con mortalidad que varió entre 30 y 100 %. En ese mismo año, en Cuba (Castañeiras et. al., 1987) Demostraron la efectividad de dos aislamientos de *Beauveria bassiana* y tres de *Metarhizium anisopliae* que eliminaron el 92% de los huevos en 15 días, en condiciones de laboratorio.

2.2.3.3 Control genético

Este método se basa en la utilización de razas que muestran más resistencia a las garrapatas. En términos generales se puede definir como la aptitud del huésped para imponer limitaciones sobre el parásito en cualquier etapa de su relación (Parras et. al., 1999).

De igual forma, (Cardozo y Franchi, 1995) la definen como la capacidad del huésped para limitar el número de garrapatas que alcanzan el estadio adulto. La resistencia es adquirida como respuesta al ataque de garrapatas y dura toda la vida. Según estos autores, aumenta con la densidad de garrapatas y es hereditaria. Los terneros que nacen de madres resistentes están protegidos hasta el destete.

Es posible desarrollar rebaños resistentes del *Bos taurus* a partir de individuos excepcionalmente resistentes, pero se necesitan muchos años para lograrse. La resistencia puede conseguirse más rápidamente a partir de entrecruzamientos con bovinos *Bos indicus*.

En general, se considera que se requiere de un 50 % de sangre de *Bos indicus* para lograr una resistencia adecuada (Rivera, 1996).

2.2.3.4 Control físico o natural

Se ha comprobado que *Boophilus microplus* en su etapa de vida libre depende, en gran medida, de las condiciones externas de humedad y temperatura, por lo que los pastoreos intensivos reducen la cobertura vegetal y pueden limitar la sobrevivencia de huevos y larvas. Las teleoginas que caen al suelo procuran un lugar protegido de los rayos solares para iniciar su postura. Por lo tanto influye la composición del tapiz vegetal donde cae la hembra repleta para encontrar esa protección; es por ello que los campos sucios con arbustos y malezas proporcionan condiciones favorables para que *Boophilus microplus* complete su ciclo biológico.

Investigaciones realizadas en Colombia determinan que la supervivencia larvaria de la garrapata fluctúa entre 30 y 60 días promedio, resultados que permiten recomendar un manejo rotacional de potreros con períodos de descanso no menor de 30 días, siendo el ideal de 45 días (Parras et. al., 1999).

Por otra parte, en los sistemas de pastoreo muchos son los enemigos naturales que se han registrado como reguladores de las poblaciones de garrapatas, los más importantes parecen ser las hormigas, hay referencias en Australia de los géneros *Iridomyrmex*, *Asphaenogaster* y

Pheidole como depredadores de adultos repletos en el suelo (Csiro 1959). Además hay referencias que las hembras de *Amblyomma cajennense* y de *Boophilus microplus* son atacados por *Solenopsis germinata* (Cerny, 1969).

(Veríssimo, 1995) Señala cuatro especies de hormigas, entre ellas, *Solenopsis saevissima* como el más importante biorregulador de *Boophilus microplus*, también depreda *Amblyomma cajennense* y *Rhipicephalus sanguineus*. En segundo lugar refiere la especie *Camponotus rengeri*, que presenta mayor actividad forrajera al anochecer y al amanecer y la hormiga *Ectatomma quadridens* que ataca a las garrapatas menos desarrolladas o menos ingurgitadas, principalmente en días húmedos.

En Cuba son varios los autores que señalan a *Pheidole megacephala* como un regulador de huevos de *Boophilus microplus* (De la vega y Díaz, 1982; Castañeiras et. al., 1987).

También se han observado otros controles naturales, (Costa, 1915) encontró ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* parasitadas por el himenóptero *Hunterellus hookeri*, posteriormente (Alfeev y Klimas, 1938) estudiaron en la antigua URSS (Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas), *Hunterellus hookeri*, parásito procedente de los EE.UU.

(Estados Unidos) y comprobaron que las ninfas de *Ixodes ricinus* y de *Dermacentor marginatum*, eran parasitadas por *Haplomitrium hookeri*.

Los artrópodos no son los únicos reguladores biológicos de las garrapatas, hay otros depredadores como es la regulación que el propio huésped ejerce mediante el lamido o rascado de su piel; las aves también actúan al deprimir las poblaciones del ectoparásito al igual que las ratas y los ratones (Barnett, 1961).

Además de lo expresado anteriormente, (Sutherst et. al., 1978) señalan que las aves pueden elevar la eficiencia de los programas de control integrado de garrapatas, sobre todo *Buphagus* spp.

2.2.4 Control biológico con hongo entomopatógenos *Beauveria bassiana*

2.2.4.1 Hongos entomopatógenos

Los entomopatógenos son microorganismos que provocan enfermedades en los insectos, y entre los agentes causales se encuentran virus, bacterias, hongos, protozoos y nematodos, entre otros. El uso de métodos biológicos de control representa ciertas ventajas como: especificidad sobre las plagas y enfermedades, bajo riesgo para el ser humano, animales benéficos y el ambiente, bajo costo gracias a su

potencial de permanencia por largos períodos de tiempo en los cultivos al tiempo de permanencia ya que en los cultivos es mayor si se compara con los productos químicos (Arenas,2009).

La patogenicidad, virulencia y agresividad son conceptos comunes en el lenguaje técnico propuesto para los hongos entomopatógenos. La virulencia es el grado de patogenicidad con que un organismo mata a un hospedero específico en condiciones programadas; la patogenicidad se define como la capacidad de un microorganismo para causar enfermedad y la agresividad se le define como la habilidad de un patógeno para invadir a su hospedero.

La variación en la virulencia de las especies de hongos y entre cepas de un mismo hongo, debe caracterizarse mediante los métodos de RAPD-PCR (Random polimorfico amplificado – Reacción en cadena de la polimerasa) la cual es una técnica confiable, ya que existen altos niveles de variación genotípica entre las diversas cepas (Bautista,2007).

2.2.4.2 Propiedades de los hongos entomopatógenos

- ✓ Poseen un alto poder residual.
- ✓ Conservan su virulencia en la preparación y antes de la dispersión del inóculo en el campo.
- ✓ La especificidad.

- ✓ Posibilidades de multiplicación y conservación en condiciones económicas rentables.
- ✓ Alto poder patógeno suficientemente estable.

2.2.4.3 *Beauveria bassiana*

Afirman que los hongos entomopatógenos presentan un reconocimiento cada vez mayor en la biodiversidad de los ecosistemas donde prestan importantes servicios ecosistémicos tanto en la producción agrícola como en el control biológico, por su capacidad natural para regular las poblaciones de insectos (Meyling y Eilenberg, 2007), evaluaron la efectividad de 259 aislados de *Beauveria bassiana* obtenidos del suelo, de garrapatas muertas y de colección fúngica para el control de *Boophilus microplus* hallando que la CL50 para 98 de los aislados más virulentos fue de 1×10^7 y $1,15 \times 10^7$ conidias \times ml⁻¹ (Posada y Lecuona, 2009)

En Zamorano se logró obtener una disminución de la población de hasta el 79% en pruebas de campo (Espinoza et. al., 2005)

Beauveria bassiana Produce micosis en los insectos, también conocida como muscardina blanca (Laboratorio de Control Biológico Zamorano, 2006).

Es un patógeno que infecta naturalmente numerosos insectos. Es considerado como una de la especies más promisorias por su potencial como agente biocontrol de insectos (España ,2000).

2.2.4.3.1 Taxonomía.

Es un hongo imperfecto de la división Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, y familia Clavicipitaceae. Este hongo, tanto en cultivo puro como en insectos, presenta un micelio algo donoso de color blanco y tiene una esporulación abundante de color crema con apariencia polvorienta, lo que le da el nombre con el que se le conoce comúnmente “muscardina blanca” (Pozo ,2012).

2.2.4.3.2 Morfología

Tiene el micelio hialino y septado que se ramifica formando conidióforos que crecen en forma de racimos. Cada conidióforo está compuesto por una célula conidiógena cuya base es abultada y conforme se aleja de la base se produce un adelgazamiento (forma de cuello de botella) del cual surge otra estructura llamada esterigma en forma de zigzag. En ésta se insertan los conidios (uno por cada quiebre del zigzag), que son globosos a sub globosos de 2 a 3 x 2 a 2,3 μm (Pozo , 2012).

2.2.4.3.3 Mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos

La enfermedad producida por hongos se llama micosis. (Tanada & Kaya, 1993) Mencionan que el desarrollo de la micosis puede ser separado en tres fases:

a) Adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto:

El proceso de adhesión, dependiendo del hongo, puede ser un fenómeno específico o no específico. Mientras que la germinación de las esporas es un proceso mediante el cual una espora emite uno o varios pequeños tubos germinativos que al crecer y alargarse da origen a las hifas, este proceso depende de las condiciones de humedad y temperatura ambiental. En menor grado la luz condiciona el ambiente alimenticio. La espora que germina en el insecto forma un tubo germinativo el cual funciona como una hifa de penetración de la cutícula. También puede producir una estructura llamada apresorio, la cual ayuda a la adhesión de la espora. El éxito de la germinación y penetración no dependen necesariamente del porcentaje de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, modo de germinación, agresividad del hongo, tipo de espora y susceptibilidad del hospedante.

b) Penetración dentro del hemocele:

Esta penetración por parte de la hifa es el resultado de la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica ejercida por el tubo germinativo. Además, depende de las propiedades de la cutícula, grosor, esclerotización, presencia de sustancias nutricionales y antifungosas y estado de desarrollo del insecto. La digestión del integumento se produce mediante las enzimas (proteasas, aminopeptidasas, lipasas, esterases y quitinasas).

c) Desarrollo del hongo que resulta en la muerte del insecto:

Luego de que llegue al hemocele, el hongo puede evitar la defensa inmune del insecto produciendo células parecidas a levaduras, llamadas blastosporas, que se multiplican y dispersan rápidamente, desarrollando protoplastos, elementos discretos ameboides, sin pared celular que no son reconocidos por los hemocitos del hospedante (Pérez, 2004) y produciendo micotoxinas. La dispersión de éstos en el hemocele depende de la especie del hongo.

Las toxinas producidas juegan un rol muy importante en el modo de acción de los hongos entomopatógenos. La muerte del insecto

se produce con mayor rapidez cuando es afectado por un hongo entomopatógeno que produce cantidades considerables de toxinas, ya que se adiciona la toxemia a la destrucción de los tejidos y a las deficiencias nutricionales (Cañedo, 2004).

2.2.5 Resistencia fisiológica a los ixodicidas

En 1981 por primera vez fue documentada en México la resistencia en poblaciones de garrapatas *Boophilus microplus* a partir de fallas de control en la región de Tuxpan, Veracruz. Debido al desarrollo de las poblaciones resistentes a los organofosforados en México, a partir de 1986 se permitió la comercialización de nuevos ixodicidas como los piretroides y el amitraz; siendo los piretroides los más usados debido a su poder residual y su estabilidad en los baños de inmersión; sin embargo, en 1993, después de 8 años, se detectaron los primeros casos de resistencia a piretroides en los estados de Tabasco, San Luís Potosí, Veracruz y Chiapas. A partir del establecimiento de la resistencia a los organofosforados y piretroides, se incrementó el uso de amitraz como una alternativa prometedora, y a principios del 2001 se detectó en la región de los Ríos en el estado de Tabasco el primer caso de resistencia a las amidinas.

El hallazgo de poblaciones multiresistentes puso en relieve un problema aún más complejo ya que la cepa, a la post red denominada “San Alfonso”, fue diagnosticada con características toxicológicas de resistencia a amidinas, piretroides y organofosforados. El 88 % de los ranchos con garrapatas resistentes a piretroides en el sureste de México son también resistentes a organofosforados, lo que sugiere una asociación en la resistencia a las dos familias de ixodidas. La generación de resistencia a piretroides el caso más serio en los ranchos seguida por amidinas y organofosforados.

La resistencia múltiple a los pesticidas en el territorio Mexicano continúa extendiéndose a razón de la presión que se ha ejercido mediante el empleo de ixodidas durante los últimos años y actualmente se han diagnosticado poblaciones resistentes de garrapatas a órgano fosforados, piretroides y amidinas, prácticamente en todo el país (Domínguez et. al. ,2010).

En los últimos años se reporta la aparición de poblaciones de garrapatas *Boophilus microplus* resistentes a diversos acaricidas, con el cual se elevan los costos para el ganadero. En el mundo existen reportes bien documentados de la resistencia que adquirió la garrapata a los productos como las amidas, arsenicales, organoclorados, carbamatos,

organofosforados, amitraz, piretroides sintéticos, ivermectina y fipronil (Pérez et. al., 2010).

2.2.6 Pruebas microbiológicas

Los micos insecticidas son productos biológicos que se utilizan en forma comercial para el control de plagas y con un alto potencial como controladores de insectos plagas en cultivos agrícolas, forestales así como de insectos vectores de importancia para la salud pública. Cabe mencionar que los productos formulados a base de hongos entomopatógenos han tenido una mayor demanda a nivel mundial; en México se observó un incremento de 22 laboratorios de producción masiva existen en 1999 a 60 laboratorios para el 2003 . Los principales hongos entomopatógenos propagados masivamente en estos laboratorios son: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* (Alatorre ,2009).

2.2.7 Concentración de esporas

Se usa con el fin de determinar los tratamientos a usar en la investigación, las cuales infectarán a el parásito.

Concentración de esporas o unidades infectivas (UI): Esta prueba se realiza para conocer la cantidad de esporas que contiene un producto, el

método convencional para conteo de unidades infectivas es mediante la cámara de Neubauer o hematócmetro. El conteo se realiza tomando un lote al azar, se pesa 1 g del producto y se disuelve en 9 ml de tween al 0,03 %, se agita. Se realiza varias diluciones 1/10 hasta que las esporas puedan observarse que están separadas. Posteriormente se realiza el conteo en la cámara de Neubauer, bajo el microscopio óptico (40X), se deben realizar diez conteos, se promedian los conteos resultantes, es importante que los conteos sean más o menos similares para obtener datos más confiables.

La concentración se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{No. De UI/ml} = \sum X (4 \times 10^6) (\text{FD}) / 80$$

Dónde:

$\sum x$ = Sumatoria del promedio de todos los conteos

$(4 \times 10^6) / 80$ = Es una constante que es = 50 000

(FD) = Factor dilución y puede ser 10, 100, 1000 dependiendo del número de dilución que se hayan realizado.

2.3 Base Conceptual

Conidias: Estructuras propagativas no motiles de los hongos producidos al extremo de un conidióforo.

Concentración Letal Media (CL₅₀): Dosis a la cual se produce la muerte en la mitad de los individuos evaluados.

Desinfección: Proceso de destrucción de los agentes infecciosos.

Efecto letal: Es una forma de expresar el grado de toxicidad de una sustancia, como la resistencia a una sustancia puede variar de una especie a otra, se expresa como la dosis tal a la que de una población de muestra dada, un porcentaje dado muere.

Entomopatógenos: Patógenos tales como virus, bacterias y hongos, entre otros, que causan enfermedades a diferentes tipos de insectos.

Esporas: Unidad reproductiva de los hongos, que se forma dentro de un esporangio.

Esporulación: Proceso que ocurre en los hongos y está relacionado con la producción de esporas, conidias, etc.

Hemocele: Cavidad general secundaria de los artrópodos, que constituye un sistema lagunar lleno de líquido hemático y forma parte del aparato circulatorio abierto.

Hongos: Microorganismos cuya nutrición es por osmosis, se reproducen sexual y asexualmente y viven como saprofitos, como parásitos o en asociación con otros organismos formando microesporas.

Inoculación: Proceso mediante el cual un patógeno y un hospedante entran en contacto.

Inoculo: Término colectivo que se refiere a los microorganismos o sus partes (esporas, fragmentos miceliales, etc.) capaces de provocar infección o simbiosis cuando se transfieren a un huésped.

Integumento: Es la cobertura o envoltura natural de un organismo.

Preparación del inóculo: Se prepararon nueve concentraciones a partir de conidias puras de *Beauveria bassiana* y un testigo en agua estéril.

Patógeno: Término que se aplica a cualquier elemento que causa enfermedades. Organismo que causan una enfermedad.

Patogenicidad: Se define como la capacidad para producir enfermedad en huéspedes susceptibles.

Virulencia: Es el grado de patogenicidad de un serotipo, de una cepa o de una colonia microbiana en un huésped susceptible.

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Ubicación Geográfica y Temporal

El lugar de estudio fue en el distrito de Tambopata, provincia de Tambopata, en el departamento de Madre de Dios, ubicado en la amazonía sur del Perú entre las coordenadas de altitud: 186 msnm, latitud sur: 9° 55' 3", longitud oeste: Entre los meridianos 77° 22' 27", Universidad Nacional Madre de Dios – laboratorios de Medicina Veterinaria y Zootecnia, con una temperatura ambiental y precipitaciones anuales promedio de 24 °C y 2 200 mm, con una área de 22 218,561 km², y una humedad relativa entre 60 y 99 % .El estudio se realizó en los meses de febrero del 2016 a diciembre del 2016.

3.1.2 Material de Estudio

Garrapata *Boophilus microplus*.

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* proporcionado por el SENASA-LIMA.

3.1.3 Población y Muestra

La muestra estuvo conformada por 400 garrapatas *Boophilus Microplus* recolectadas de 4 establos de la zona y que no habían recibido tratamiento contra garrapatas, las cuales se identificaron en laboratorio y se realizó la inoculación con hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*.

3.1.4 Criterio de Inclusión y Exclusión

Criterio de inclusión: Se incluyó a todas las garrapatas *Boophilus microplus* sanas y no tratadas con acaricidas.

Criterio de exclusión: Se excluyó a todas las garrapatas que no sean de la especie estudiada, y las que puedan estar infectadas con el hongo o que hayan recibido algún tratamiento químico 20 días antes de la recolección.

3.2 Método

3.2.1 Tipos y Modalidad de Investigación.

Dado que la investigación consistió en la manipulación de variable experimental, en condiciones controladas, con el fin de describir de qué modo se produce un evento particular. El tipo de investigación fue “Experimental Comparativa”.

3.2.2 Diseño Procedimental de la Investigación.

Diseño completamente al azar (DCA o DCR).

Se analizó el efecto del hongo entomopatógenos *Beauveria bassiana* a través de la mortalidad de la Garrapata *Boophilus microplus* in vitro. Se aplicó en el siguiente procedimiento:

Para la ejecución del experimento se colectaron 400 garrapatas adultas, las cuales se distribuyeron de 10 en 10 en cada placa Petri en nueve concentraciones distintas y un testigo, las concentraciones aplicadas las hallamos con la línea base teniendo en cuenta el producto comercial a usar- el hongo entomopatógeno se adquirió de Lima SENASA.

Tabla 1. Diseño del procedimiento de la investigación

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	TOTAL
R1	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100
R2	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100
R3	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100
R4	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100
TOTAL	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	400

T10 = tratamiento testigo

T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8 y T9 = concentraciones de *Beauveria bassiana* con/ml

R1, R2, R3, R4 = repeticiones

10 = número de garrapatas *Boophilus microplus*

3.3 Recolección de datos

3.3.1 Concentración letal media (CL₅₀) de *Beuaveria bassiana* para el control de *Boophilus microplus* in vitro

Para determinar la concentración letal media se procedió de la siguiente manera:

- a) Del producto adquirido de SENASA- LIMA en primer lugar se determinó la calidad del hongo (viabilidad y concentración) habiéndose determinado una germinación mayor al 90 %.

b) Seguidamente se preparó una solución madre de 400 ml constituida por agua destilada y 12,8 g. de conidias más una gota solución Tween al 1%. a continuación se tomaron 218 ml de esta solución madre y se mezcló con 182ml. de agua destilada para obtener 400 ml. de solución que tuvo a una concentración menor a la solución madre y se procedió de la misma manera hasta obtener la menor concentración y (9 concentraciones y un testigo con agua estéril) (Fernández ,2006) las concentraciones obtenidas luego de realizadas las diluciones fueron:

- $2,15 \times 10^9$ conidias/ml
- $6,00 \times 10^8$ conidias/ml
- $2,80 \times 10^8$ conidias/ml
- $2,30 \times 10^8$ conidias/ml
- $1,60 \times 10^8$ conidias/ml
- $9,00 \times 10^7$ conidias/ml
- $5,50 \times 10^7$ conidias/ml
- $4,50 \times 10^7$ conidias/ml

- $1,00 \times 10^7$ conidias/ml
- testigo

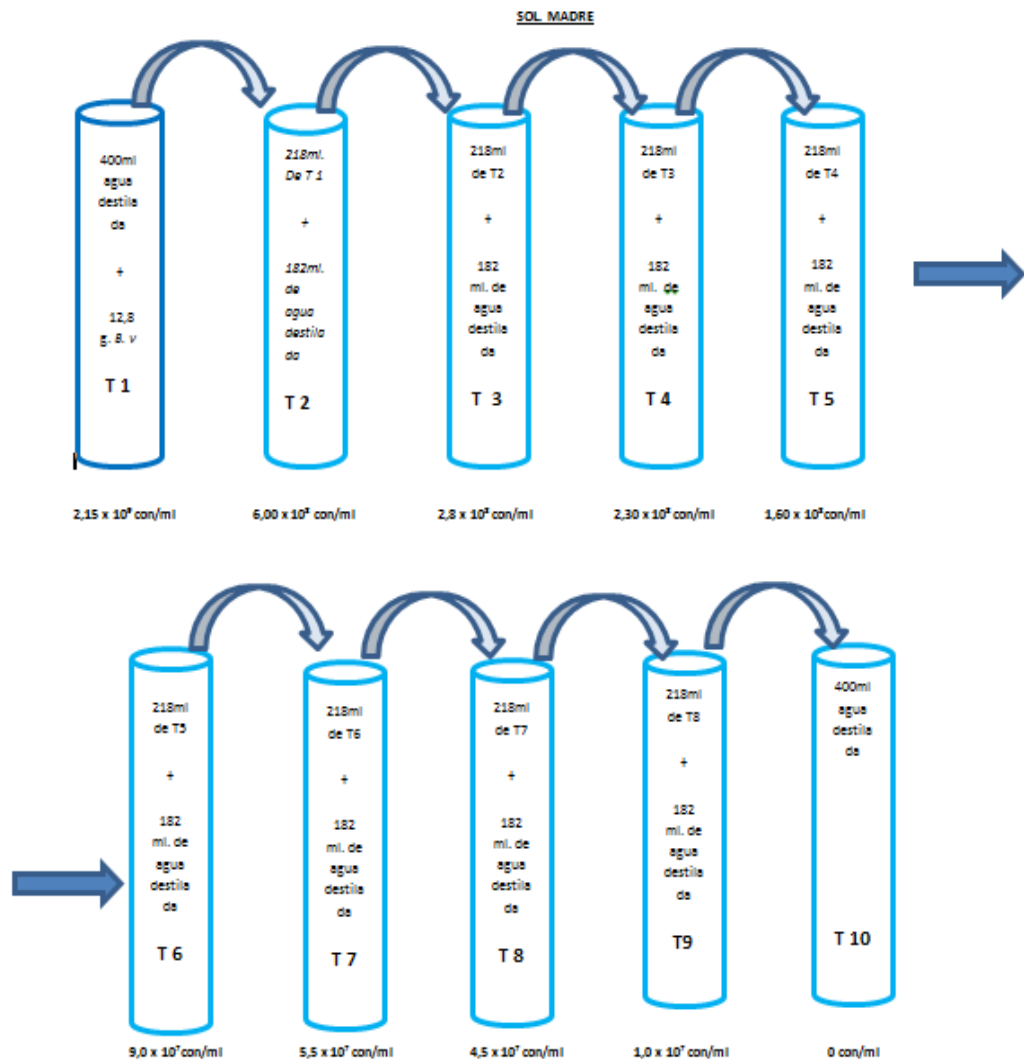


Figura 1. Esquema del procedimiento de las diluciones (9 tratamientos y el tratamiento testigo)

c) Inoculación:

- Para la inoculación usamos un tubo de ensayo vacío (1) y un tubo de ensayo donde se preparó el tratamiento (2) con el hongo entomopatógeno.
- Se colocaron las 10 garrapatas *Boophilus microplus* en el tubo 1 y en éste vertimos el líquido del tubo 2 y se realizó la inmersión.
- Al cabo de 10 minutos vaciamos el inóculo junto con las garrapatas en un vaso precipitado vacío con una gaza estéril de modo que escurriera el agua.
- Seguidamente colocamos el papel toalla para absorber el excedente de líquido.
- Luego fueron colocadas en cámaras húmedas, preparadas con placas Petri con un trocito previamente esterilizado de algodón húmedo y ligeramente selladas con para film y luego fueron llevadas a la estufa a t° ambiente, con 4 repeticiones por cada concentración; utilizamos un total de 400 garrapatas. Tal como se explica en la tabla 1 con la finalidad de determinar la dosis letal media a través de la mortalidad de *Boophilus microplus*

3.3.2 Mortalidad de garrapatas in vitro producida por la *Beauveria bassiana*

- a) La mortalidad del *Boophilus microplus* se determinó mediante el conteo de las mismas y la verificación de la presencia del hongo con la esporulación sobre ellas.

La evaluación se inició a las 24 horas después de la inoculación y de manera diaria durante 21 días, solamente se contaron las garrapatas muertas en las que el desarrollo del hongo se da sobre el cuerpo de la misma desarrollándose colonias que se asemejan a un algodón blanco (ver anexo).

Para estimar la mortalidad del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* se usaron la fórmula de Abbott recomendada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO (2004)

Cuya fórmula es:

Mortalidad Corregida

$$MC = \frac{M_{bot} - M_{control}}{100 - M_{control}} \times 100$$

Dónde:

MC = Mortalidad corregida,

M_{obt} = Mortalidad obtenida y

$M_{control}$ = Mortalidad en el testigo.

3.3.3 Tiempo de acción de la *Beauveria bassiana* en el control de *Boophilus microplus* in vitro

Para determinar el tiempo de acción se realizó observaciones diarias en cada una de las repeticiones y teniendo en cuenta el último día en que se presentaban muertes, luego se procedió a sacar un promedio de las mismas y de esa manera determinar el tiempo de efectividad

3.4 Análisis de Datos

Para el análisis estadístico se utilizó: el diseño ANOVA en un diseño completo al azar, y se determinó la influencia de las variables independientes sobre las variables dependientes.

Se ejecutó el estudio, y se empleó el diseño completamente al azar (DCA o DCR), cuyo modelo es el siguiente:

$$Y_{ijk} = u + T_i + B_j + E_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Observación del tratamiento

U = Promedio general

T_i = Efecto del tratamiento

B_j = Efecto de bloque

E_{ijk} = Valor aleatorio, error experimental de la unidad experimental.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Concentración letal media (CL₅₀) de *Beauveria bassiana* para el control de *Boophilus microplus* in vitro

Tabla 2. Concentración letal media de *Beauveria bassiana*

Tratamientos conidias/ml.											
Repeticiones	T1 2,15 x 10 ⁹	T2 6,00 x 10 ⁸	T3 2,80 x 10 ⁸	T4 2,30 x 10 ⁸	T5 1,60 x 10 ⁸	T6 9,00 x10 ⁷	T7 5,50 x10 ⁷	T8 4,50 x10 ⁷	T9 1,00 x10 ⁷	T10 testigo	
R1	5	8	10	2	2	1	2	2	5	0	
R2	0	9	8	4	1	1	2	5	1	0	
R3	2	9	7	4	3	2	2	10	3	0	
R4	1	6	6	4	2	1	2	5	1	0	
total	8	32	31	14	8	5	8	22	10	0	138

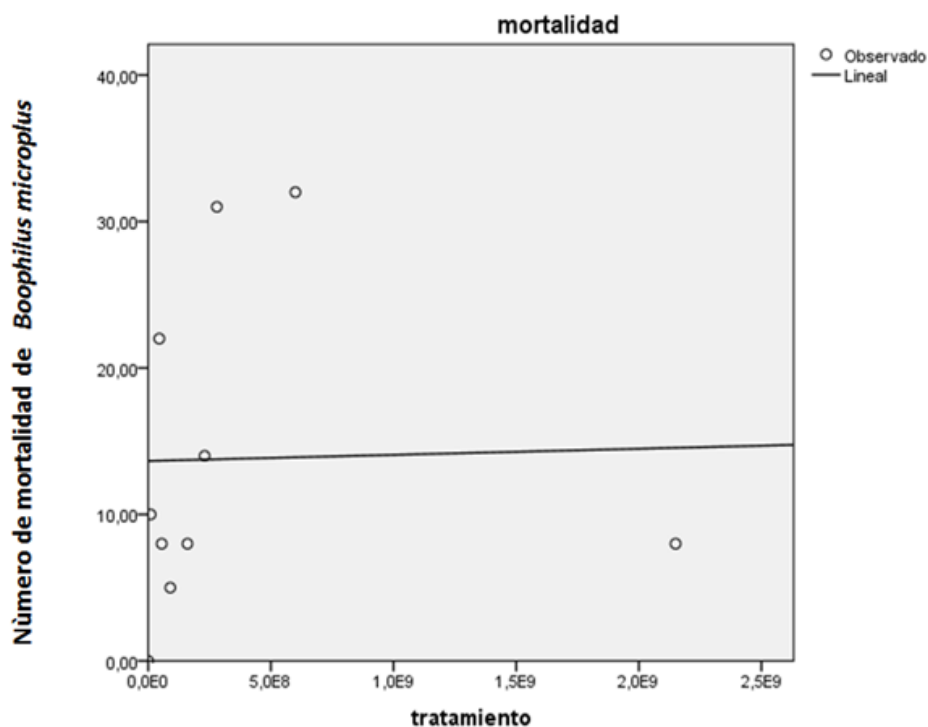


Figura 2. Concentración letal media (CL₅₀) de *Beauveria bassiana* para el control de *Boophilus microplus*.

En la tabla 2 se observa los diez tratamientos con sus respectivas repeticiones y el total de garrapatas muertas por cada tratamiento como resultado de la acción de la *Beauveria bassiana*, esto durante los 21 días de observación (Anexo 1), además se observa que la concentración letal media corresponde al tratamiento 4 que corresponde a la concentración de $2,30 \times 10^8$ esto debido a que teniendo en cuenta que la concentración letal media indica que es la dosis que causa la muerte a la mitad de individuos evaluados; así pues teniendo en cuenta que en el presente experimento las unidades de estudio estuvo constituido por 10 garrapatas

Boophilus microplus por lo tanto la mitad de la población evaluada sería 5, sin embargo en el tratamiento 4 la mortalidad mayormente fue de 4 garrapatas en cada repetición lo cual se confirma con lo que se observa en la figura 2.

4.2 Mortalidad de garrapatas in vitro producida por la *Beauveria bassiana*

Tabla 3. Mortalidad de *Boophilus microplus* causada por la *Beauveria bassiana*

MORTALIDAD			
Tratamientos	Dosis Con/ml	Numero de Garrapatas	Porcentaje %
T 1	$2,15 \times 10^9$	8	20,0 %
T 2	$6,00 \times 10^8$	32	80,0 %
T 3	$2,80 \times 10^8$	31	77,5 %
T 4	$2,30 \times 10^8$	14	35,0 %
T 5	$1,60 \times 10^8$	8	20,0 %
T 6	$9,00 \times 10^7$	5	12,5 %
T 7	$5,50 \times 10^7$	8	20,0 %
T 8	$4,50 \times 10^7$	22	55,0 %
T 9	$1,00 \times 10^7$	10	25,0 %
T 10	0	0	0,0 %
		138	

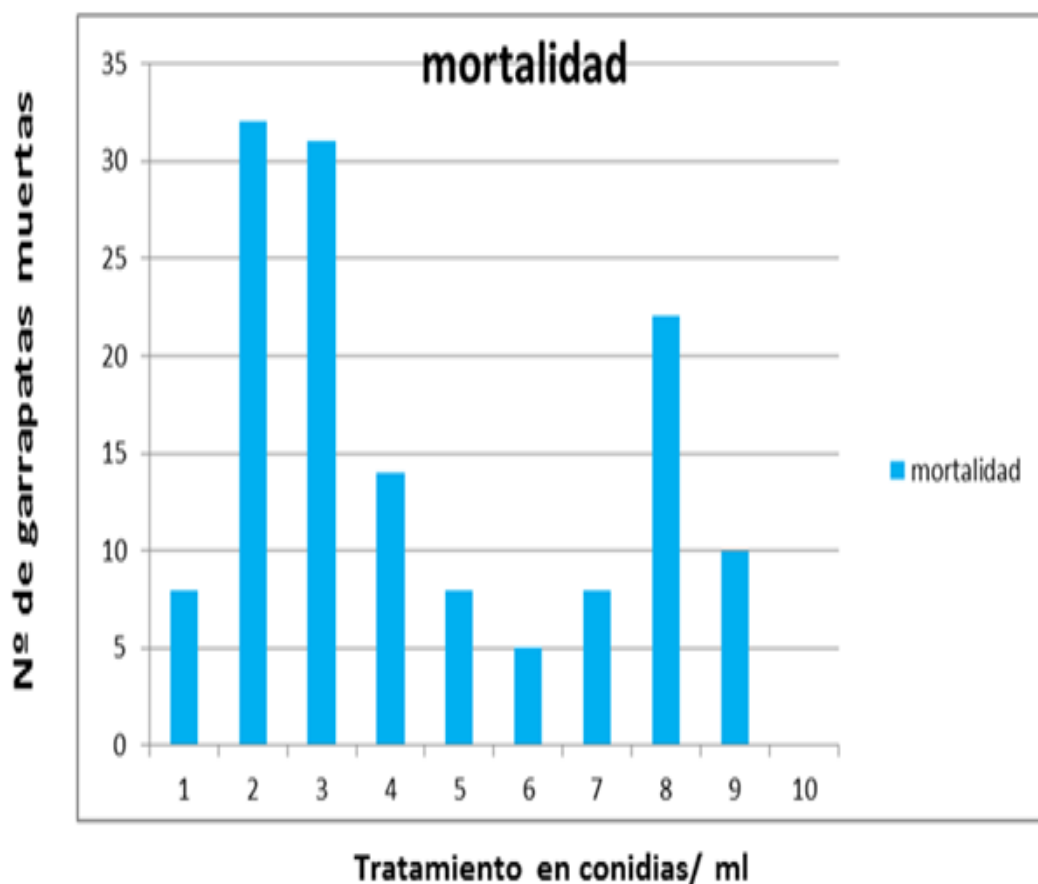


Figura 3. Mortalidades de *Boophilus microplus* por cada tratamiento

En la tabla 3 se observa el número total de mortalidades por cada tratamiento, tanto en número de garrapatas como en porcentaje, así también en la figura 3 tenemos un gráfico que nos muestra mortalidades en comparación en número de garrapatas por los 10 tratamientos. Como es de esperarse observamos que a mayor concentración generarán mayor efecto patógeno, pero sin embargo como se indica en la figura 3

nos muestra que los tratamientos que mayor mortalidad causaron fueron los tratamientos 2 y 3 seguido de los tratamientos 8 y 4 y en menor proporción los demás tratamientos, se observa también que la mortalidad total fue 138 garrapatas lo cual es corroborado al aplicar la fórmula de Abbot.

$$MC = \frac{M_{obt} - M_{control}}{100 - M_{control}} \times 100$$

Dónde:

MC = Mortalidad corregida,

M_{obt} = mortalidad obtenida y

$M_{control}$ = mortalidad en el testigo.

$$Mc = \frac{138 - 0}{100 - 0} \times 100 = 138$$

Determinación del porcentaje de mortalidad:

$$\text{Mortalidad \%} = \frac{138 \times 100}{400} = 34,5\%$$

Donde se tiene que el porcentaje de mortalidad es de 34,5%.

4.3 Tiempo de acción de la *Beauveria bassiana* en el control de *Boophilus microplus* in vitro

Tabla 4. Promedio de los días de acción de la *Beauveria bassiana*

TRATAMIENTOS										
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T 10
Repeticiones	2,15 x10 ⁹	6,00 X10 ⁸	2,80 x 10	2,30x10 ⁸	1,60 x 10 ⁸	9,00 x10 ⁷	5,50x10 ⁷	4,50x10 ⁷	1,00x10 ⁷	
	con/ml	con/ml	con/ml	con/ml	con/ml	con/ml	con/ml	con/ml	con/ml	
R1	20 días	20 días	19 días	11 días	13 días	8 días	12 días	7 días	20 días	0 días
R2	0 días	19 días	19 días	19 días	5 días	12 días	8 días	15 días	10 días	0
R3	19 días	19 días	19 días	16 días	9 días	11 días	11 días	15 días	16 días	0
R4	6 días	15 días	21 días	20 días	14 días	8 días	16 días	16 días	12 días	0
promedio	11,25	18,25	19,50	16,50	10,25	9,75	11,75	13,25	14,50	0 13,9

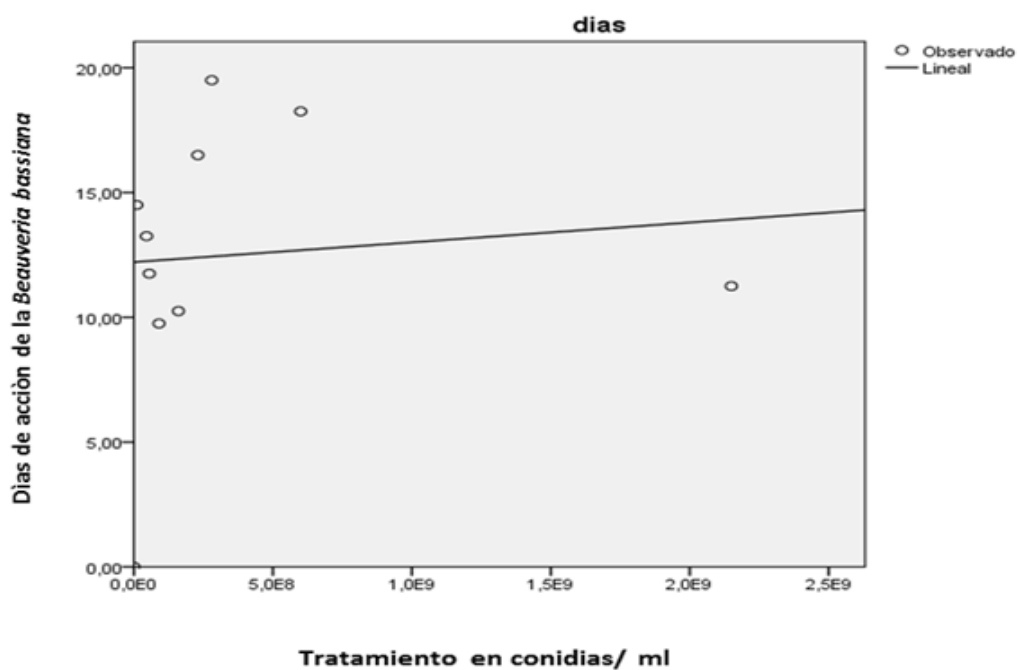


Figura 4. Tiempo de acción de la *Beauveria bassiana* en el control de *Boophilus microplus* in vitro.

En la tabla 4 se observan los 10 tratamientos con el tiempo de acción por cada repetición y cada tratamiento, sacando un promedio por el total de repeticiones de cada tratamiento y así poder determinar el tiempo de acción de la *Beauveria bassiana*, la tabla nos indica el tiempo de días que el hongo actuó presentando esporulación en las garrapatas, se hicieron observaciones diarias y se tomaron datos de la tabla teniendo en cuenta la formación de esporas. Teniendo como resultado 13,9 días lo cual concuerda con la figura obtenida en el programa SPSS.

4.4 Contrastación de la hipótesis

Tabla 5. Análisis de varianza de diseño completamente al azar (DCA).

Fuente variación	Suma cuadrados	Grados de libertad	C. medio de error	Formula calculada	Probabilidad 1%	Valor crítico 5%	
tratamiento	269,4	9	29,93	11,44	3,087	4,72	**
error	78,5	30	2,62				
Total	347,9	39					
CV	46,89						

Como "F calculado" es mayor a "F tabulado" tanto al 5 % y como al 1%, entonces se concluye que un 99% de certeza podemos hallar diferencias altamente significativas entre tratamientos, rechazándose la hipótesis nula bajo el mismo nivel de significación.

El coeficiente de variabilidad nos muestra un valor bajo (46,89%), hecho que nos demuestra que los datos están dentro de la distribución normal, y que podemos continuar con los análisis.

Tabla 6. Prueba de significancia de Tuckey

Tratamientos	dosis/con/ml	promedio de mortalidad	significación	
			5%	1%
T2	$6,00 \times 10^8$	8,0	a	a
T3	$2,80 \times 10^8$	7,8	a b	a b
T8	$4,50 \times 10^7$	5,5	a b c	a b c
T4	$2,30 \times 10^8$	3,5	c d	a b c d
T9	$1,00 \times 10^7$	2,5	c d	c d
T1	$2,15 \times 10^9$	2,0	c d	c d
T5	$1,60 \times 10^8$	2,0	c d	c d
T7	$5,50 \times 10^7$	2,0	c d	c d
T6	$9,00 \times 10^7$	1,3	d	c d
T10	testigo	0,0	d	d

Con un 99% de certeza podemos afirmar que la dosis de $6,00 \times 10^8$ con/ml, $2,80 \times 10^8$ con/ml, $4,5 \times 10^7$ con/ml y $2,30 \times 10^8$ con/ml de *Beauveria bassiana*, producen mayor mortalidad de *Boophilus microplus*, al mismo tiempo dichos promedios son estadísticamente iguales tal como se observa en la tabla 7. Contrariamente también podemos ver que los tratamientos 9,1,5 y 7 son los que muestran menor mortalidad y el tratamiento 4 estaría corroborando que es la CL₅₀ porque tiene una

mortalidad de 3,5 y abarca a, b, c y d en el grado de significación para 1%.

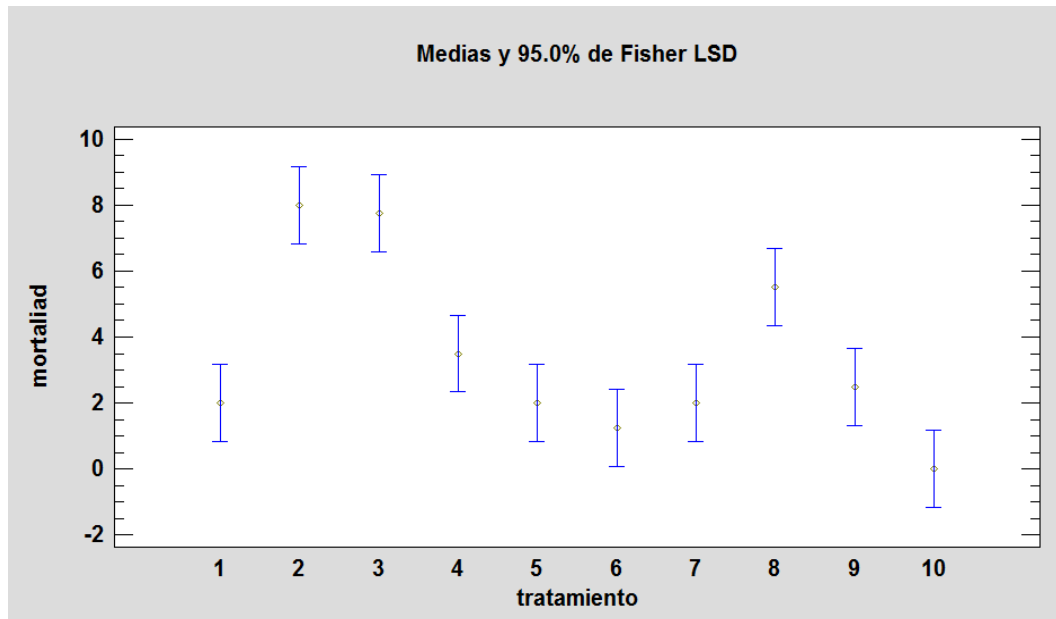


Figura 5. Cuadro comparativo de diferencias entre tratamientos de Fisher

En la tabla 7, como en la figura 5 se aplican un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras y demostrar los tratamientos que estadísticamente sean iguales. Como se observa en la figura 5 los tratamientos con mayor mortalidad fueron el 2, 3 y el 8 siendo el de menor mortalidad el 6.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Concentración letal media (CL₅₀) de *Beauveria bassiana* para el control de *Boophilus microplus* in vitro.

El resultado del presente estudio brinda información sugiriendo que el uso de estos microorganismos pueden ser promisorios como un método alternativo para el control de garrapatas en vez de seguir haciendo uso indiscriminado del control químico. No obstante se requiere realizar estudios a nivel de campo que permitan desafiar bajo condiciones multifactoriales.

La CL₅₀ fue de $8,45 \times 10^7$ con/ ml con 82 % de mortalidad determinado por (Tondelli, 2006) comparado con los resultados de $2,30 \times 10^8$ con/ml con 35% de mortalidad, estos valores son muy diferentes, esto podría deberse a que en tal ensayo las dosis fueron menores a las del presente estudio , sin embargo su mortalidad obtenida fue más alta, esta diferencia de eficacia podría deberse a la capacidad de la cepa del hongo para penetrar la cutícula de la garrapata.

Mortalidad de garrapatas producida por la *Beauveria bassiana* in vitro.

Los resultados del presente estudio nos indican que aunque todos los aislamientos fueron probados y éstos fueron patógenos causando mortalidad en *Boophilus microplus*, tienen diferentes tipos de virulencia entre cada tratamiento.

En estudios previos (Mayta, 2000) demuestra que para *Beuveria bassiana* tuvo un 57 % de mortalidad (esto en campo) que comparado al 34,5 % (in vitro) del presente estudio, es un poco menor; esto se puede deber a factores geo climáticos que no fueron estables.

Efecto de diferentes medios biológicos sobre las fases de la garrapata (Pérez 2007) cuya concentración fue de 1×10^9 con/ml donde obtuvieron un 90 % de mortalidad(se usó previamente control químico)en comparación a una de nuestras dosis más altas de $6,00 \times 10^8$ con/ml con un 80 % de mortalidad, si bien es cierto son similares esta pequeña diferencia podría deberse a que en tal estudio se usó previamente control químico ; donde pudieron tomar en cuenta la base de : muchos de estos agentes biológicos pueden aumentar la eficiencia de control en combinación con métodos químicos debido al aditivo o efectos sinérgicos

obteniendo así una reducción significativa en el uso de productos químicos, los acaricidas(Leal et. al. ,2003;Wenzel et. al., 2004)

(Bautista ,2007) a una concentración de $1,3 \times 10^{12}$ obtuvo una mortalidad de 76,6 % mientras que en el presente trabajo con una de las dosis más altas ($2,15 \times 10^9$) la mortalidad fue de solo 20 % ,esto podría atribuirse a que en el presente trabajo se podrían haber formado cadenas conidiales o cúmulos que tras no ser rotas, el hongo no se pudo desarrollar por completo, no mostrando así manifestaciones de esporulación.

(Fernández ,2010) obtuvo que con 50×10^6 con/ml hasta $3,125 \times 10^6$ tuvo un 90% de mortalidad, mientras que en uno de nuestros tratamientos $1,0 \times 10^7$ con/ml se obtuvo una mortalidad de 25 % esto podría deberse a que en dicha tesis tomaron como unidad de estudio a garrapatas multiresistentes, tales podrían estar susceptibles a cualquier otro tratamiento no químico, además en nuestro estudio este tratamiento es uno que tiene menor mortalidad, tras la observación en la toma de datos pudimos observar que al pasar de los días alguna garrapatas estaban repletas, estadio en el que son más tolerantes, por lo menos al control químico (Ming et. al. ,2013). Ovoposición; tienen alta resistencia y

adaptación al medio ambiente aun en condiciones de laboratorio (Rodríguez, 2009)

De tiempo de acción de la *Beauveria bassiana* en el control de *Boophilus microplus* in vitro.

En el presente trabajo se obtuvo como tiempo de acción 13,13% promedio, teniendo mortalidades desde el día 5 post aplicación hasta el día 21 con mortalidades desde 12,5 % hasta 80%.

(Pérez ,2007) tuvo una mortalidad de 90% a los 21 días de acción como se observa nuestros resultados son similares, pero sin embargo (Broglio ,2012) tuvo una mortalidad desde 88% hasta 100% y (Sepulveda et. al., 2017) obtuvo una mortalidad todavía más alta el día 10 post tratamiento 100% de mortalidad.

Estas diferencias pueden deberse a las diferentes especies y cepas debido a que algunas pueden actuar con mayor agresividad.

Por otro lado parte de las condiciones climáticas pueden impedir o favorecer, que los agentes de control biológico alcancen su pleno potencial en el control, aun en condiciones de laboratorio por su susceptibilidad a los cambios de temperatura y humedad (Kaaya y Gagler, 1993).

CONCLUSIONES

1. El hongo entomopatógeno infecta y controla de manera efectiva las garrapatas *Boophilus microplus* siendo así una opción para sustituir a los productos químicos.
2. El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* tiene una concentración letal media (CL₅₀) que corresponde a la concentración de $2,30 \times 10^8$ conidias/ml.
3. La mortalidad de *Boophilus microplus* frente a la *Beauveria bassiana* fue de 34,5 % en condiciones de laboratorio.
4. El tiempo de acción de la *Beauveria bassiana* en el control *Boophilus microplus* in vitro fue de 13,9 días.

RECOMENDACIONES

1. Continuar con más investigaciones frente a las aplicaciones y pruebas en laboratorio y tener especial cuidado en la siembra en agar (PDA).
2. Evaluar concentraciones de *Beauveria bassiana* en dosis más bajas a las usadas en la investigación para poder obtener mayor porcentaje de mortalidad.
3. Realizar pruebas de CL_{50} en garrapatas en ninfas y huevos, evaluando si las diferentes características de la cutícula hacen variar la efectividad del hongo entomopatógeno. Evaluar aplicaciones de la DL_{50} en campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alatorre, R. R. (2009). *Manual de control de calidad de microorganismos patógenos*. Villahermosa. Tabasco.: XXXI congreso nacional de control biológico.
- Alfeev, N. I., & Klimas, Y. V. (1938). Experience in cultivating ichneumon flies, *Hunterellus hookeri*,. *Obtained from United States, which destroy Ixodid ticks from soviet fauna.*, 98 . 101.
- Álvarez, V., Bonilla, R., & Chacón , I. (2003). *Comportamiento de la resistencia a los acaricidas organofosforados y piretroides sintéticos por la garrapata Boophilus microplus (la garrapata común del ganado) en diez fincas de Costa Rica*. Boletín de Parasitología, Costa Rica.
- Arenas, Y. B. (2009).) *Utilización de hongos entomopatógenos para el control del salivazo Aeneolamia varia (Hemiptera: Cercopidae)*. Programa de variedades entomología cenicaña.
- Barnett, S. F. (1961). *Lucha contra las garrapatas del ganado*. Roma, Italia.: FAO. Obtenido de Lucha contra las garrapatas del ganado.

Bautista. (2007). Control biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* con hongos entomopatógenos.

Bazán, T. M. (2002). *Efecto de Metarhizium anisopliae (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en el control biológico de Boophilus microplus Canestrini (Acari: Ixodidae) en ganado bovino estabulado*. Tesis, Tecomán, Colima.

Betancourt, A., Patiñot, F., Torres, O., & Eugenio, B. (2004). *Prueba de estado para evaluar la efectividad de Tickvac MK contra la garrapata Boophilus microplus*. ACOVEZ.

Broglio-Micheletti Sônia M. F., De Souza, L. A., Valente, C. N., De Araujo M. J. Da Silva, N. D. & Gomez, M. L. (2012). *Evaluation of entomopathogenic fungi as biological control agents Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae)*. Chile: Universidad Federal de Alagoas.

Cañedo, V. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima - Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP).

Cardozo, H., & Franchi, M. (1995). Garrapata. Epidemiología y control de *Boophilus microplus*. En *Enfermedades parasitarias de importancia*

económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención.
(págs. 369 - 402). Editorial Hemisferio Sur.

Castañeiras, A., Jimeno, G., López, M., & Sosa, W. (1987). Efecto de la *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Fungi imperfecti) y *Pheidole megacephala* (Hymenoptera: Formicidae) contra huevos de *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Revista Salud Animal*, (9) 288 - 293.

Cetrá, B. (2001). *Sitio Argentino de Producción Animal*. Obtenido de Garrapata común del bovino.

Costa Lima, A. (1915). The calcid *Hunterellus hookeri* Howard, a parasite of the tick *Rhipicephalus sanguineus* Latreille. *Revista Veterinaria. Zootech.*, 5 (4):200-203.

De la vega, R., & Díaz, G. (1982). Depradación de la garrapata del ganado vacuno, *Boophilus micropilus*, por la hormiga *Pheidole megacephala*. *Revista Ciencia Tecnología*, 5(2):97-100.

De Sousa, J. R., & Furlong, J. (2005). Os carrapatos, os carrapaticidas e a resistencia. En *Em: Carrapatos: problemas e soluções* (pág. 65). Brasil: Eds. J. Furlong.

Domínguez, D. I., Rosario, R., Almazán, Consuelo, & Saltijeral, J. A. (2010). *Boophilus microplus*: biological and molecular aspects of acaricide resistance and their impact on animal health. *Revista Tropical and Subtropical Agroecosystems*, (12) 181 - 192.

Drugueri, L. (2004). *Sitio de producción Argentina*. Obtenido de Garrapatas de los animales:

<http://www.zoetecnocampo.com/foro/Forum4/HTML/000143.html>

Embrapa. *Goiás lança campanha de controle de carrapato bovino* . 2005.

<http://www.agronline.com.br/agronoticias/noticia.phpid=1632> .

Encinas, A., Oleada, A., & Pérez, R. (1999). Garrapatas duras. En *Parasitología veterinaria* (págs. 420 - 429). Madrid, España: Editorial Mc Graw-Hill- Interamericana.

España, L. M. (2000). *Caracterización enzimática de aislados de Beauveria bassiana (Deuteromycotina: Hyphomycetes), y su virulencia sobre Epilachna varivestis (Coleoptera: coccinellidae)*. Tecomán, Colima.: Universidad de Colima.

Espinoza Silva, L. (2005). *Evaluación de cepas de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae en control biológico de Boophilus microplus*. Tesis Ingeniero Agrónomo, Honduras.

FAO. (2003). *Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina*. . Roma, Italia: Dirección de Producción y Salud Animal. Obtenido de Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. .

Fernández, E. K., & Bittencourt, V. (2008). Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Revista Experimental and Applied Acarology*, (46) 71 - 93.

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

Fernández & Tondelli J. (2006). *Evaluación de la eficiencia del control de garrapatas. (Boophilus microplus)*. Tesis Ingeniero Agrónomo, Honduras.

García, J. (2011). *Garrapatas: Un problema a tener en cuenta*. Obtenido de <http://jairoserano.com/2011/07/garrapatas-un-problema-a-tener-encuenta>

IICAB (INSTITUTE FOR INTERNATIONAL COOPERATION IN ANIMAL BIOLOGICS). (2007). *Lowa state university college of veterinary medicine*. Obtenido de [www. Cfsph.iastate.edu/](http://www.Cfsph.iastate.edu/) IICAB

Mayta, A. L. (2000). "*Control biológico de la ectoparasitosis en bovinos por boophilus microplus mediante el uso de hongos entomopatogenos en la irrigación de Majes- Arequipa, 1999*". Tesis, Arequipa - Perú.

Merchan & Delgado, X. L. (2015). *Control biológico con hongos entomopatogenos : una estrategia de aula para promover el cuidado del medio ambiente*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Meyling, N. V., & Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological contro. *Revista Biological Control*, 145-155.

Ojeda, C. M.(2007). *evaluacion in vitro del efecto entomopatogeno de las cepas Ma34, Ma 14 y Ma 2 del hongo Metarhizum anisopliae para el control de la fase larval y adulta de Boophilus microplus(cannestrini)*. Merida, Yucatan. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatan.

Parras, M. H., Peláez, S. L., Segura, C. F., Arcos, J. C., Londoño, A., Díaz, E., & Vanegas, M. A. (1999). Manejo integrado de garrapatas en bovinos. *Serie modular para la capacitación en tecnologías agropecuarias*, (págs. 72 - 77).

Pérez - Cogollo , L. C. , Rodríguez - Vivas, G. T., Ramírez - Cruz, G., & Miller, J. (2010). First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Vet Parasitol*, 168:165-169.

Pérez León, J. M. (2007). *Efecto de diferentes medios biológicos en el control de las garrapatas de bovinos*. Tesis, España.

Pérez, C. N. (2004). *Manejo Ecológico de Plagas*. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural – CEDAR.

Polar, P. M. , Aquino, M., Kairo, M., Moore, D., Pegram, S., & Jhon, S. (2005). Thermal Characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control on cattle ticks. *Revista Vet Parasitol*, (3)159 - 167.

Posada, J. B., & Lecuona, R. E. (2009). Selection of native isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for the microbial control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari:

Ixodidae). *Revista Journal of Medical Entomology*, p. 284-291. doi:
<http://dx.doi.org/10.1603/033.046.0213>

Pozo, S. C.(2012). *Efectividad de un microencapsulado de Beauveria bassiana sobre Metamasius spinolae*. Yautepec, Morelos: Efectividad de un microencapsulado de Beauveria baInstituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos.

Rand, K. N. , Moore, T., Sriskantha, A., Spring, K., Tellam, R., Willadsen, P., & Cobon, G. (1989). Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, (86) 9657 - 9661.

Rivera, M. (1996). *Hemoparasitosis Bovinas*. Caracas, Venezuela.: ANAUCO Ediciones.

Rodríguez, M., Montero, C., Redondo, M., Méndez , L., Valdés, M., Lleonart , R., . . . Machado, H. (2002). “Extensión e impacto de la vacuna Gavac en el programa de lucha contra *Boophilus microplus* en Cuba”. *Premio Anual de Innovación Tecnológica, Agencia de Ciencia y Tecnología*, . Ministerio de ciencia, tecnología y medio ambiente.

- Rodríguez, M., Penichet, M., Mouris, A., Labarta, V., Luaces, L., Rubiera, R., de la Fuente, J. (1995). Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Revista Veterinary Parasitology*, (57) 339 - 449.
- Romaña, C. A., Fargues, J., & Poys, J. F. (1987). Mise au point d'une methode biologique de lutte contre les triatomines, vecteurs de la maladie de chagas avec des, hyphomycetes entomophogenes. *Bull. Soc. Path. Ex*, (80) 105 - 111.
- Sepúlveda, M. O., Pulido, M., & Rodríguez - P., E. (2017). Eficiencia in vitro de hongos entomopatógenos y productos químicos sobre *Rhipicephalus microplus* ISSN 2011-5415. Volumén 11 Número 2.
- Sutherst, R., Warton, W., & Vlech, K. B. (1978). *Guide to studies on tick ecology. Division of Entomology. Technical Paper.*
- Tanada, Y., & Kaya, H. K. (1993). *Insect pathology*. California, USA: Academic Press, San Diego.
- Tondelli, J. A. (Noviembre 2006). *Evaluacion de la eficiencia del control de garrapatas (boophilus microplus) con tres frecuencias de aplicacion*

de Bazam Beauveria Bassiana. Zamorano, Honduras: CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA.

Valdés, M., Méndez , L., Quintana, Y., Montero, C., Machado, H., Lleonart, R., & Borroto, C. (2005). Evaluación de la eficacia en ensayos controlados del inmunógeno Gavac Plus contra dos cepas Argentinas de la garrapata *Boophilus microplus*. *Congreso Biotecnología 2005*. Habana, Cuba.

Veríssimo, C. J. (1995). Inimigos naturais do carrapato parasita dos bovinos. *Revista Agropecuária*, 8(1):35-37.

ANEXOS

**Anexo 2. Capacitación por el laboratorio control biológico SENASA –
Lima**



Anexo 3. Agar papa dextrosa(PDA): Papa 125 g, en 250 ml de agua destilada, hervir hasta cocer la papa y filtrar, agregar dextrosa 9 g y agar agar 10g.



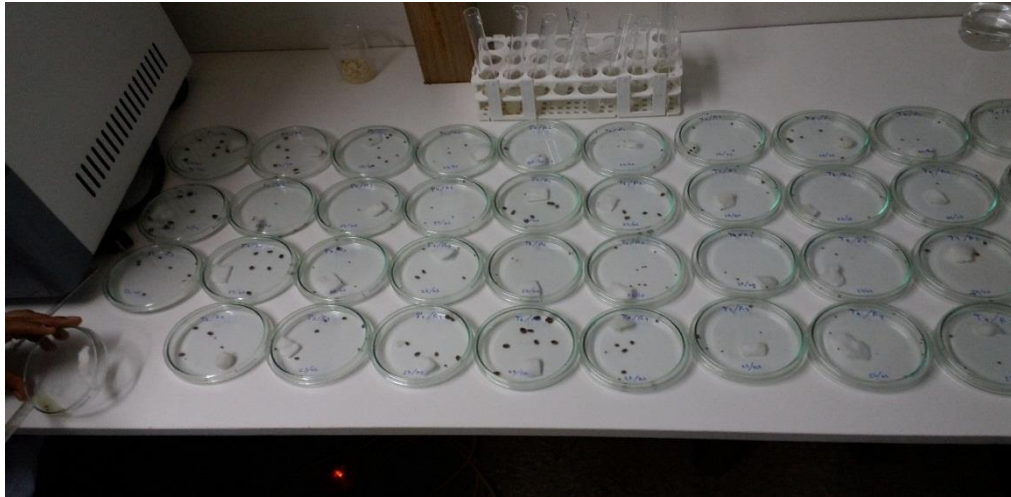
Anexo 4. Plaqueo: De 10 a 15ml de PDA/placa (cámara de flujo laminar).



Anexo 5. Siembra del hongo *Beauveria bassiana* en agar PDA laboratorio de parasitología – C.P. M.V.Z – UNAMAD.



Anexo 6. Los 9 tratamientos de *Beauveria bassiana* y un testigo con 4 repeticiones en un diseño completo al azar, con 400 unidades experimentales *Boophilus microplus*



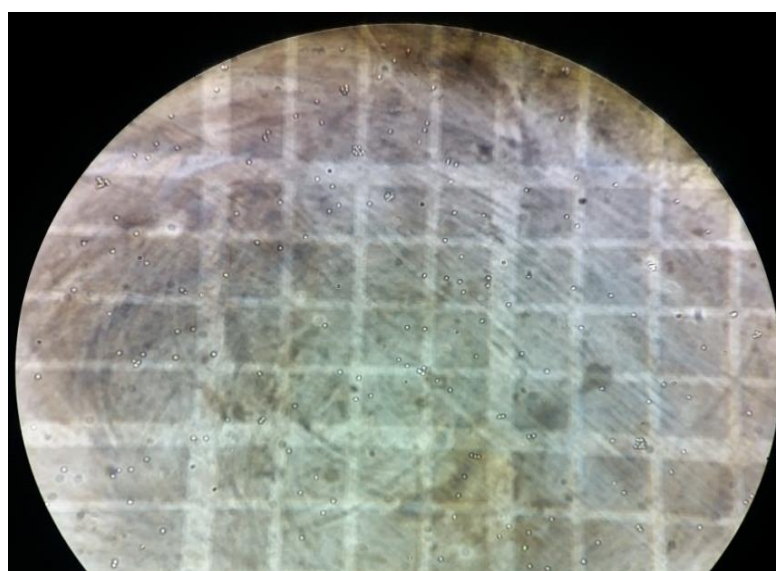
Anexo 7. Esporulación a los 7 días post exposición.



Anexo 8. Prueba de calidad conteo de conidias en cámara Neubauer.



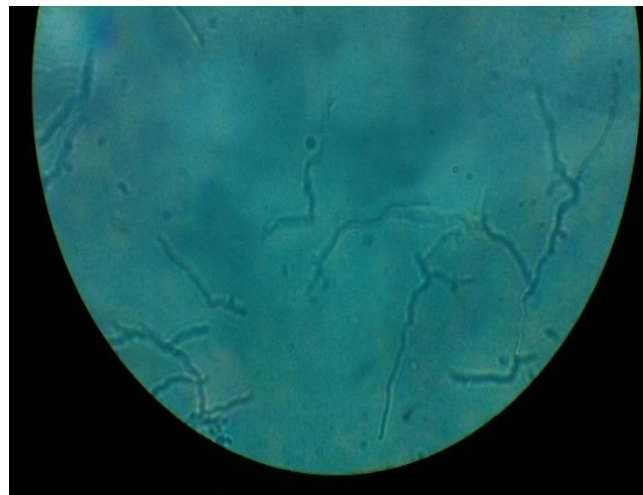
Anexo 9. Prueba de calidad conteo de conidias en cámara Neubauer.



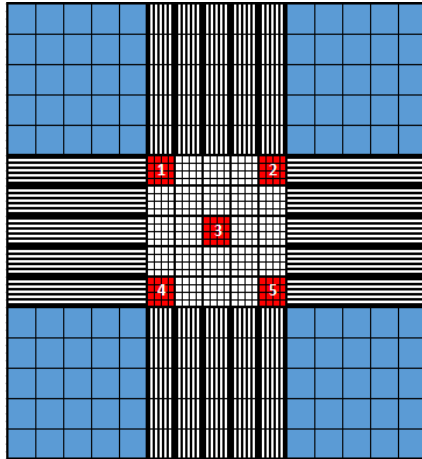
Anexo 10. Prueba de calidad viabilidad de las esporas.



Anexo 11. Prueba de calidad y viabilidad de las esporas.



Anexo 12. Ficha de conteo de conidias



Fecha: Hora:

N° de tratamiento

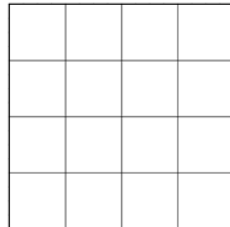
Concentración de Tratamiento

.....

Observaciones

.....

1



2

