

DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA PATOGENICIDAD DEL HONGO *Beauveria Bassiana* Y *Metarhizium Anisopliae* SOBRE EL ECTOPARÁSITO DEL GANADO BOVINO *Boophilus Microplus*

JAIRO YOVANNY GUANCHA VILLOTA

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
SAN JUAN DE PASTO
2013**

DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA PATOGENICIDAD DEL HONGO *Beauveria Bassiana* Y *Metarhizium Anisopliae* SOBRE EL ECTOPARÁSITO DEL GANADO BOVINO *Boophilus Microplus*

JAIRO YOVANNY GUANCHA VILLOTA

**TESIS DE GRADO como requisito para optar al título de
MÉDICO VETERINARIO**

**Director de Tesis
JOSE GERARDO ORTIZ MOLINA. M.V**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
SAN JUAN DE PASTO
2013**

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son de responsabilidad exclusiva de su autor”. Artículo 1° del acuerdo N°. 323 de octubre 11 de 1966, emanada por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad De Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

VoBo. JOSE GERARDO ORTIZ MOLINA

HÉCTOR FABIO VALENCIA RÍOS

EUDORO BRAVO RUEDA

AGRADECIMIENTOS

José Gerardo Ortiz Molina y Jenny Díaz, por tenerme paciencia y colaborarme cuando necesitaba ayuda.

Katia Benavides del Laboratorio de la clínica veterinaria de la universidad de Nariño, que siempre me prestó su ayuda y colaboración.

A mis amigos Herney Bernal y Ana Patricia Lasso, por estar pendiente de mí y las palabras de aliento en tiempos de dificultad.

Leonardo Lasso, por sus palabras de sabiduría.

A SOLUCIONES MICROBIANAS PARA EL TRÓPICO, por proporcionarme las cepas de los hongos entomopatógenos.

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron para la realización y culminación del presente trabajo.

DEDICATORIA

A Mi Dios que siempre me acompañó dándome fortaleza y sabiduría para sobrellevar el tiempo de dificultad.

A mi esposa, por su apoyo incondicional.

A mis hijos, por estar siempre a mi lado.

A mis padres, gracias a ellos por el esfuerzo que han hecho por mí.

A mis hermanos, que han puesto cada uno parte de sus vidas y oraciones para apoyarme y realizar mis metas.

RESUMEN

El presente estudio se realizó en los laboratorios de la clínica veterinaria ALBERTO MARTÍNEZ de la Universidad de Nariño, en los meses de octubre a diciembre de 2012, con el objeto de determinar la patogenicidad los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de la garrapata (*Boophilus microplus*).

Se recolectaron en campo garrapatas del género *Boophilus microplus* y fueron llevadas al laboratorio donde se inocularon por el método de inmersión, con dos hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*; seguidamente fueron colocadas en platos de petri, observándose a los 7 y 14 días para contar las garrapatas muertas e infectadas.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre especie y concentración. Se usó un Diseño experimental irrestrictamente al Azar bifactorial para 2 tratamientos (cepas) y 6 subtratamientos (concentraciones) y el testigo.

Las soluciones de concentración evaluados fueron; 1×10^8 , 1.25×10^9 y 2.25×10^{10} conidias/ml para *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* obteniéndose mortalidades de 90%, 49,5% y 80% para *Beauveria bassiana* y para *Metarhizium anisopliae* del 90%, 80% y 40%.

La solución de concentración que mayor mortalidad ocasionó fue la de 1×10^8 para *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

ABSTRACT

The present study came true at the clinical veterinary's laboratories ALBERTO MARTÍNEZ of the University of Nariño, in the months of October to December 2012, for the purpose of determining the patogenicidad mushrooms *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for the cattle tick's biological control (*Boophilus microplus*).

They recollected at field cattle ticks of the I generate *Boophilus microplus* and they were taken to the laboratory where *bassiana* and *Metarhizium* inoculated for the method of immersion, with two mushrooms *Beauveria themselves anisopliae*; Straightaway they were drugged in dishes of petri, observing to the 7 and 14 days to tell the dead and infected cattle ticks.

The statistical analysis evidenced significant differences between sort and concentration. Bi-factorial for 2 treatments (ancestries) and 6 sub-treatments (concentrations) and the witness used an experimental Design itself unrestrictedly at random.

The solutions of concentration evaluated matched ; 1×10^8 , 1.25×10^9 y 2.25×10^{10} conidias/ml for *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* obtaining 90 %'s, 49.5 %'s and 80 %'s mortalities for *Beauveria bassiana* and for *Metarhizium* the 90 %'s, 80 %'s and 40 %'s *anisopliae*.

The solution of concentration that bigger mortality caused matched give it 1×10^8 for *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. OBJETIVOS	19
1.1 OBJETIVO GENERAL	19
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2. MARCO TEÓRICO	20
2.1 DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA Y CICLO DE VIDA DE <i>Boophilus Microplus</i>	20
2.1.1 Acciones patógenas	19
2.1.2 Acción patógena expoliatrix	19
2.1.3 Acción patógena mecánica	21
2.1.4 Acción patógena tóxica	21
2.1.5 Acción patógena necrótica	21
2.1.6 Acción traumática	21
2.1.7 Acción vectora	22
2.2 RESISTENCIA	22
2.2.1 Importancia de la resistencia en <i>Boophilus Microplus</i>	22
2.3 AGENTES ENTOMOPATÓGENOS	24
2.3.1 Hongos entomopatógenos	24
2.3.2 Aspectos generales	24
2.3.3 Clasificación taxonómica de <i>Beauveria bassiana</i>	26
2.3.4 Clasificación taxonómica de <i>Metarhizium anisopliae</i>	26

2.3.5	Modo de acción	27
2.3.6	Utilización de hongos en el control de insectos	28
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1	LOCALIZACIÓN	30
3.2	METODOLOGÍA	30
3.2.1	Recolección de garrapatas en campo	30
3.2.2	Activación de la virulencia del hongo <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>	31
3.3	PRUEBA DE VIRULENCIA	32
3.3.1	Desinfección de garrapatas	32
3.3.2	Preparación del inóculo	32
3.3.3	Inoculación de las garrapatas	32
3.3.4	Determinación del porcentaje de mortalidad	33
3.3.5	Tratamiento	33
3.4	VARIABLES MEDIDAS	34
3.5	DISEÑO EXPERIMENTAL	34
3.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1	MORTALIDAD	35
5.	CONCLUSIONES	38
6.	RECOMENDACIONES	39
7.	BIBLIOGRAFÍA	41
8.	ANEXOS	44

LISTA DE CUADROS

	Pag
Cuadro 1. Concentraciones para la aplicación de los hongos <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> .	33
Cuadro 2. Mortalidad de garrapatas.	35
Cuadro 3. Análisis de varianza para la evaluación de dos hongos <i>Bauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliea</i> .	36
Cuadro 4. Evaluación estadística entre especies.	36
Cuadro 5. Evaluación estadística de mortalidad de garrapatas con tres concentraciones de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> .	37

LISTA DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. Recolección de garrapatas	30
Figura 2. Microcultivo	31
Figura 3. Mortalidad de garrapatas	34

LISTA DE ANEXOS

	Pag
Anexo A. Garrapata del género <i>Boophilus Microplus</i> .	44
Anexo B. Ciclo de vida de <i>boophilus microplus</i> .	45
Anexo C. Colonia de <i>Bauveria bassiana</i> .	46
Anexo D. Esporas <i>Bauveria bassiana</i> .	47
Anexo E. Colonia de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	48
Anexo F. Esporas de <i>Metarhizium anisipliae</i> .	49

GLOSARIO

Apresorio: estructura fungosa en el extremo del tubo germinativo que le sirve de anclaje o para absorber sustancias de su hospedante.

Basípeta: se refiere a la posición basal de la conidia más joven, o cerca de la célula conidiógena.

Conidia: Espora asexual inmóvil formada directamente a partir de una hifa o célula conidiógena o esporógena.

Conidias: estructuras propagativas no móviles de los hongos producidas al extremo de un conidióforo.

Conidióforo: hifa especializada, en cuyo extremo apical se insertan los conidios.

Desinfección: proceso de destrucción de los agentes infecciosos.

Desinfectantes: aquellas sustancias químicas que matan las formas vegetativas y no necesariamente las formas de resistencia de los microorganismos patógenos.

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.

Esterilización: es el proceso de destrucción de toda forma de vida microbiana.

Fase imperfecta: fase asexual de los hongos.

Fase perfecta: en los eumicetos, fase sexual.

Fiálide: célula conidiógena en forma de botella, donde se forman las conidias.

Hialino: transparente.

Hifa: cada uno de los filamentos tubulares que constituyen el micelio en todo su espesor, lo cual confiere un aspecto no estratificado.

Hipostoma: Parte de la boca de los artrópodos por debajo del labio inferior.

Hongos: microorganismos cuya nutrición es por ósmosis, se reproducen sexual y asexualmente y viven como saprófitos, como parásitos o en asociación con otros organismos formando micorrizas.

Hongos entomopatógenos: Son aquellos que parasitan diferentes órdenes de artrópodos

Hospedante: organismo que permite el desarrollo de patógenos (huésped).

Inóculo: cualquier porción del patógeno capaz de producir infección.

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

Larva: estado inicial en el ciclo de vida del insecto (estado inmaduro en la metamorfosis de un insecto). Las larvas nacen de los huevos y por lo general tienen el aspecto de un gusano.

Lípidos: sustancias cuyas moléculas constan de glicerina y ácidos grasos.

Metabolismo: actividad bioquímica que ocurre en los seres vivos para llevar a cabo los procesos esenciales para su supervivencia.

Micelio: estructura vegetativa de los hongos, constituida por filamentos llamados hifas.

Microorganismo: organismo vivo que vive en diferentes medios.

Morfología: estudio de la forma y estructura externa de los seres vivos.

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

Peritecio: ascocarpo globoso y cerrado provisto de un ostiolo. Propio de hongos Ascomycetos.

Proteína: compuesto orgánico formado por una o más cadenas de aminoácidos.

Rizoide: hifas estériles que se fijan al sustrato.

Saprofito: organismo que vive de materia orgánica muerta o en descomposición.

Sustrato: material sólido distinto del suelo, natural o de síntesis, mineral u orgánico que, colocado en un contenedor, en forma pura o en mezcla, permite el anclaje del sistema radicular, desempeñando por tanto un papel de soporte para la planta. Se denomina así al material sobre el que se propaga un organismo.

Synema: conidioma más o menos compacto, de hifas vegetativas erectas, que sostienen a las conidias.

Teleogina : Garrapata adulta ingurgitada o repleta de sangre.

Teleomorfo: estado sexual o perfecto de un hongo.

Tóxico: aquello que tiene un efecto dañino y mortal.

Toxina: compuesto que producen los microorganismos y que es venenoso para las plantas y para los animales.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas las industrias químicas han desarrollado acaricidas, insecticidas y antihelmínticos de gran eficiencia y aplicación práctica, lo que llevó al productor agropecuario a su utilización sistemática e intensiva, sin diagnóstico ni asesoramiento profesional. El mal uso de estos, trajo como consecuencia la aparición de resistencia de los parásitos a los productos químicos. De acuerdo a Colciencias (2003) en Colombia se ha calculado que las garrapatas causan pérdidas anuales superiores a los ciento nueve millones de dólares; además las pérdidas económicas ocasionadas por enfermedades hemoparasitarias (babesiosis y anaplasmosis) son cuantiosas y se puede estimar una disminución del 40% en leche y un 58% en carne. Según la FAO (2005) se ha estimado que en países con buen sistema de control, las pérdidas ocasionadas por ectoparásitos alcanzan del 10 al 20% del valor total de la producción anual, y en países con sistemas deficientes de control, el porcentaje es entre el 30 y el 40% del valor anual de la producción.

El control de garrapatas basado en el uso exclusivo de químicos es insostenible a largo plazo, por el desarrollo de resistencia y presencia de residuos; así pues, se reporta resistencia múltiple de *Boophilus microplus* con un 95% de resistencia a los Piretroides Sintéticos (PS) y Amitraz (amidinas), además del alto costo de estos productos. Por otra parte los baños garrapaticidas penetran la piel, envenenan poco a poco al animal, generando residuos en la leche y carne (Colciencias 2003).

Las garrapatas son parásitos de muchas especies de animales de sangre fría o caliente entre ellos el ganado bovino de leche o de carne, existiendo una especificidad relativa hacia sus hospederos (Gallardo y Morales 1999)

Las garrapatas del ganado vacuno (*Boophilus microplus* Canestrini, 1887) son el principal problema veterinario en las regiones tropicales y subtropicales (Rodríguez *et al* 1995). Son un grupo de parásitos artrópodos hematófagos causantes de una enfermedad parasitaria externa 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). Son también vectores de enfermedades, entre ellas:

- Babesiosis o piroplasmosis. Causada por *Babesia bigemina*, *B. argentina*, *B. bovis* y *B. divergens*. Son protozoos que atacan a los glóbulos rojos disminuyendo su cantidad funcional, llegando a ocasionar anemia, decaimiento, pérdida de la coordinación, hepatomegalia y esplenomegalia (Agrandamiento del hígado y del bazo, respectivamente), ictericia y hasta la muerte del animal.
- Anaplasmosis. Causada por *Anaplasma marginale*, rickettsia que ataca a los glóbulos rojos ubicándose en la periferia de éstos (en los márgenes). Díaz y Coromoto (s.f.) señalan que ocurre un aumento de la temperatura en los animales hasta alcanzar los 41°C, además se presenta anemia y síntomas asociados, como

ser la ictericia, disminución de la producción de leche y carne, problemas reproductivos, pérdida de condición corporal y la muerte.

La anaplasmosis y la piroplasmosis se heredan a través de los huevos de la garrapata, de modo que las larvas nacen con la capacidad de transmitir el agente causal (Drugueri 2004).

Para el control biológico de las garrapatas se han utilizado hormigas entomófagas, parasitoides y también hongos entomopatógenos. Entre los hongos entomopatógenos se encuentran: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Verticillium lecanii*, logrando un control en laboratorio de hasta un 100% de los parásitos y efectividades técnicas de campo entre 75 y 80% (Rijo s.f.)¹. En Zamorano se logró obtener una disminución de la población de hasta el 79% en pruebas de campo (Espinoza 2005)².

El aislado de *Verticillium lecanii* (CIAT 215) en condiciones in Vitro, el hongo mostró ser efectivo contra hembras teleóginas de *B. microplus* especialmente en la concentración $1,25 \times 10^8$ conidios/ml que indujo un 100% mortalidad, un menor tiempo de supervivencia, un menor tiempo de ovoposición y de eclosión de huevos provenientes de teleóginas de *Boophilus microplus* inoculadas (Beltran & col 2008)³.

El manejo integrado de plagas, involucra controles biológicos, etológicos, culturales y químicos. Dentro de este, el control biológico mediante el uso de agentes entomopatógenos, se constituye en una herramienta importante encaminados a obtener certificaciones en buenas prácticas ganaderas

Buscando alternativas de solución a estos problemas, que sean sostenibles a largo plazo, se desarrollo el presente trabajo cuyo objetivo era determinar la patogenicidad de los productos biológicos BOVETROPICO® (*Beauveria bassiana*) y METATROPICO® (*Metarhizium anisopliae*) en la garrapata (*Boophilus Microplus*) bajo condiciones de laboratorio.

¹ RIJO, C. E.; NAVARRO, G.; RODRÍGUEZ, R. M.; MURILLO, E. Y. 1998. Efectividad de *Verticillium lecanii* sobre la fase parasítica de la garrapata *Boophilus microplus* (Acari: Metastigmata: Ixodidae). Revista Colombiana de Entomología 24 (1-2): 67-69.

² ESPINOZA, L.R. 2005. Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y de *Metarhizium anisopliae* en control biológico de *Boophilus microplus*. Honduras Tesis (Ing. Agr) zamorano. Honduras 17 p

³ BELTRAN, C; GUTIÉRREZ, A.I.; SILDARRIAGA, Y. 2008. Patogenicidad de *Lecanicillium lecanii* (Fungi) sobre la garrapata *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) en laboratorio. Rev. Colombiana. Entomologia.v.34, n.1, Bogotá, ene./jun.2008.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia de los aislamientos de *Beauveria bassiana* y de *Metarhizium anisopliae* en el control de la garrapata *Boophilus microplus*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar bajo condiciones controladas de laboratorio, la patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* y de *Metarhizium anisopliae* sobre el ectoparásito del ganado bovino *Boophilus microplus*.
2. Determinar la concentración de conidias por ml de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* que cause mayor porcentaje de mortalidad.
3. Realizar una identificación microscópica de la morfología de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*

2. MARCO TEÓRICO

2.2 DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA Y CICLO DE VIDA DE *Boophilus microplus*

Garrapatas *Boophilus microplus* pertenece a la Clase *Arachnida* Orden *Acarina* Familia *Ixodidae*. Presenta rostro corto, con ojos, palpos con arrugas transversas y peritremos circulares. El macho es muy pequeño y presenta un surco atrás que rodea el ano. El macho fecunda a la hembra y muere a los pocos días. La hembra se desprende y en el suelo inicia la postura en 2 a 6 días, por un período de 8 a 20 días. El tiempo de incubación puede durar hasta 50 días (según el clima y humedad). Las larvas nacen con tres pares de patas y se fijan al hospedador, muda de cutícula en 7 días y pasa a ninfa (con 8 patas), en 8 a 9 días muda y luego adulto, garrapatas de un solo hospedador. El ciclo total es de 19 a 22 días por término medio en climas medios o templados, esta familia puede sobrevivir de 21 a 27 meses sin alimento (Vélez 1995 citado por Espinoza, L R; 2005)⁴.

2.1.1 Acciones patógenas. La garrapata es uno de los ectoparásitos de mayor importancia a nivel mundial, debido a las pérdidas que ocasiona en la producción de carne y leche en el ganado, además de otros daños que podemos observar como lo son:

- ✓ Disminución del consumo de alimento.
- ✓ Disminución de peso.
- ✓ Retraso en el crecimiento.
- ✓ Desarrollo de enfermedades transmitidas por estos ectoparásitos tales como anaplasmosis y babesiosis entre otras.
- ✓ Depreciación de las pieles a causa de las perforaciones producidas por el piquete.

La pérdida de peso de un bovino parasitado por garrapatas *Boophilus* spp se calcula en 0.26 kg/garrapata/año, y por *Amblyomma* spp hasta 1.09 kg/garrapata/año (manual bayer, 2008)⁵.

2.1.2 Acción patógena expoliatrix. Todas las garrapatas son hematófagas desde su estado larval hasta su estado de imago, por lo cual la anemia y las consecuencias de la misma constituyen un síntoma casi constante (Espaine y

⁴ ESPINOZA SILVA, L. 2005. Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en control biológico de *Boophilus microplus*. Tesis Ing. Agr. Honduras. Zamorano. 16 p.

⁵ ANÓNIMO, 2008. Manual Bayer de la garrapata. Disponible (en línea): www.tupeluqueriacanina.com

Lines, 1983)⁶. Cada garrapata hembra puede llegar a extraer 3 centímetros cúbicos de sangre y provocar una disminución del incremento del peso corporal de hasta 1 gramo. (Monica J. & col 2008)⁷

2.1.3 Acción patógena mecánica. Todas las especies de garrapatas que se adhieren a la piel de los animales producen traumatismo al introducir su hipostoma en dicho órgano. Su secreción salival impide la coagulación de la sangre por una toxina y la presencia del hipostoma en los tejidos provoca infiltración inflamatoria de los tejidos perivasculares del corion, hiperemia local, edema y hemorragia, junto con engrosamiento del estrato córneo, produciéndose una acción mecánica en dicha lesión (Espaine y Lines, 1983)⁹.

2.1.4 Acción patógena tóxica. Todas las garrapatas emiten una toxina anticoagulante con su saliva permitiendo de esta manera que la sangre fluya sin coagular llegando en esta forma al intestino medio de ella. Estas toxinas pueden provocar parálisis en ovejas, perros y hasta en animales mayores. Tiene manifestaciones más graves aun mortales cuando la garrapata inyecta su toxina en lugares cercanos a la base del cerebro o a la medula espinal. Los síntomas son, una toxemia generalizada, con 40°C temperatura, parálisis flácida rápidamente ascendente, disfagia, disnea y muerte. La toxina más concentrada es la producida por una garrapata hembra adulta (Espaine y Lines, 1983)⁹.

2.1.5 Acción patógena necrótica. Todas las garrapatas con su hipostoma al introducirlo en la piel originan una necrosis por lisis del tejido al provocar la infiltración inflamatoria quedando posteriormente en el lugar lesiones cicatrizales permanentes (Espaine y Lines 1983)⁹.

2.1.6 Acción traumática. Esta acción patógena también es originada por todas las garrapatas con su órgano de fijación y sus uñas. Al abandonar el hospedero los ixodidos, dejan una lesión en la piel la cual se cicatriza posteriormente dando lugar a una merma en el valor de los cueros que pueden llegar a una depreciación de los mismos hasta de un 50% (Espaine y Lines, 1983)⁹. Las heridas causadas por las picaduras de garrapatas son problemáticas. Cuando están abiertas, se pueden formar gusaneras porque atraen a las moscas que producen miasis. Y cuando cicatrizan, el cuero resulta de menor calidad. (Monica J. et al, 2008)⁸.

⁶ ESPAINE, L. LINES, R. 1983. Manual de Parasitología y Enfermedades Parasitaria I. Instituto Superior de Ciencias Agropecuaria, Habana, Cuba 557 p.

⁷ MONICA, J. CHRISTENSEN, F. FARBER, M 2008. Garrapata de los bovinos: Una amenaza de ocho patas para el ganado del NOA rev. *Salta Productiva*, Año V, No. 25, Diciembre 2008.

2.1.7 Acción vectora. Las garrapatas tienen una importancia considerable tanto en medicina veterinaria como en medicina humana por su acción patógena vectora como inoculadores biológicos de varias enfermedades (Espaine y Lines, 1983)⁹.

Es evidente que la importancia de la acción debilitante de un parásito hematófago está relacionado en forma directamente proporcional con el número de elementos parasitarios que en casos benignos disminuyen o anulan la ganancia de peso del ganado afectado y en manifestaciones importantes pueden causar bajas considerables en un hato (Castellano et.al; 1990)⁸. La permanente exposición a picaduras de garrapata causa, por tanto, debilitamiento, propensión a contraer otras enfermedades, irritación de la piel, y merma en la producción de leche y carne (Monica J. et al, 2008)⁸.

2.2 RESISTENCIA

Resistencia se define como la capacidad de un grupo de parásitos (garrapata) para sobrevivir al garrapaticida seleccionado, que usado en forma y concentración correcta, aniquila a los individuos considerados como normales y que además esta resistencia se trasmite a su descendencia (Anonimo 2006)⁹

Los acaricidas comerciales empleados para controlar las infestaciones de *Boophilus microplus* Canestrini (Acari:Ixodidae), además de no resolver definitivamente el problema, son también tóxicos para los bovinos y para el propio ser humano.(Martins, R.M.; González, F.H.D.2006)¹⁰.

Los productos químicos son necesarios para la mejor producción pero no son fácilmente renovables puesto que su investigación y desarrollo para estar disponibles en el mercado puede llevar hasta 10 años con un costo entre 100 a 300 millones de dólares. (FAO, 2003)

Existen distintos tipos de resistencia, que pueden ser:

- ◆ Alteración del comportamiento del parásito.

⁸ CASTELLANO G. F. L 1990. Estudio de la Efectividad Garrapaticida del Compuesto Cypergan 15 en las Razas Aberdeen Angos y Brahman en el Departamento de Boaco, Nicaragua. Tesis (Ing Agr) Managua Nicaragua 44p.

⁹ ANÓNIMO, 2006; Publicación de Laboratorios Virbac México, No. 45, Mayo 2006.

¹⁰ MARTINS, R.M.; GONZÁLEZ, F.H.D.2007; Uso del aceite de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) (Panicoidideae) como acaricida frente a la garrapata *Boophilus microplus* Canestrini (Acari:Ixodidae).Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.9, n.4, p.1-8, 2007.

- ◆ Resistencia a la penetración donde el tegumento de la garrapata se modifica y retrasa la penetración del producto.
- ◆ Cambios en la sensibilidad del sitio de acción del producto. Para los piretroides en el canal de sodio y para carbamatos y fosforados en el canal de la Acetil colina.
- ◆ Resistencia metabólica donde las enzimas del artrópodo se modifican y anulan el compuesto.

Existen tres fases en el desarrollo de la resistencia a acaricidas que son:

1. Establecimiento. Ocurre mediante un mecanismo de preadaptación, por lo general a través de mutaciones naturales e independientes de procesos de selección, manifestándose por una tasa proporcional al tamaño de la población. La introducción del alelo resistente, proveniente de una subpoblación en la que se encuentra ya establecido, puede obviar esta fase y dar lugar a la siguiente.

2. Dispersión. Ocurre mediante la sobrevivencia preferencial de individuos resistentes, al ser aplicados tratamientos acaricidas. Asumiendo la predominancia del proceso de selección heterocigótica, esta fase tiene lugar en un período relativamente corto. En éste el alelo se encuentra aún en baja preferencia y no son detectables las fallas en la efectividad de los productos, llevándose a cabo la dispersión hacia localidades vecinas en forma desapercibida.

3. Emergencia. En esta, el alelo resistente es lo suficientemente común para reducir la efectividad de los tratamientos. La selección homocigótica es importante, obteniéndose una tasa de selección muy alta y con una duración muy corta. Como consecuencia a la previa dispersión de los alelos resistentes, los acaricidas dejan de ser efectivos gradualmente en la región de influencia.

2.2.1 Importancia de la resistencia en *Boophilus Microplus*. La resistencia a los acaricidas, ha sido definida como el problema principal en el control químico de la garrapata por varios expertos. La importancia económica del problema de resistencia, va en relación directa con la dependencia que exista en el tratamiento químico para abatir poblaciones de garrapata, que se ha definido como el factor determinante más importante para la aparición y desarrollo de resistencia, obligando al ganadero a tomar una de las siguientes medidas.

- Incremento en la concentración original recomendada.
- Incremento en el número de tratamientos, con calendarios cerrados de bañado.
- Cambio a otro producto con ingrediente activo diferente al cual las garrapatas muestran resistencia, generalmente más caro.

Los trabajos realizados con cepas de *Rhipicephalus(Boophilus) microplus* en varias partes de Colombia han mostrado grados diversos de resistencia a compuestos piretroides (Deltametrina, Cipermetrina; Flumetrina; Alfacipermetrina; y Lambdacialotrina); al Metilcarbamato y a uno o varios de los compuestos organoclorados y fosforados.

2.3 AGENTES ENTOMOPATÓGENOS

Dentro de los agentes entomopatógenos se incluyen bacterias, hongos, virus, nemátodos y protozoos fundamentalmente. Generalmente se caracterizan por su escasa toxicidad sobre otros organismos del ambiente, por su aptitud para ser tratados industrialmente, es decir, se cultivan, formulan, empaquetan, almacenan y se comercializan como un insecticida convencional. Estos insecticidas biológicos penetran en el insecto plaga por ingestión, y también por contacto en el caso de los hongos.

2.3.1 Hongos entomopatógenos. Los hongos entomopatógenos son los que han recibido mayor atención por la gran variedad de especies y amplio rango de hospedantes así como por su crecimiento microscópico sobre la superficie de su huésped. (Cañedo V; Ames T; 2004)¹¹.

En Colombia se evaluó de forma comparativa 10 aislamientos de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii* sobre teleóginas de la garrapata *Boophilus microplus* (Moreno *et al.*, 2001)¹².

2.3.2 Aspectos generales. El crecimiento saprofita puede dar como resultado la producción de conidióforos, conidias y desarrollo miceliano. Esta característica permite que el hongo pueda ser cultivado en el laboratorio utilizando técnicas de producción en masa de bajo costo (Cañedo V; Ames T; 2004)¹⁴

¹¹ CAÑEDO, V; AMES, T; 2004 Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú; Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, p 6.

¹² MORENO, R.; HERNÁNDEZ, F.; BENAVIDES, E.; COTES, A.M.; ROMERO, A.; GÓMEZ, M.I.; & GARCÍA, L.P. 2001. Evaluación in vitro de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii* para el control de la garrapata *Boophilus microplus* (Canestrini) (Mestastigmata: Ixodidae). En: "Resúmenes XXVIII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, SOCOLEN". Pereira, Colombia, 8-10 de agosto de 2001. SOCOLEN: 43.

El mismo autor afirma que es importante conocer las principales ventajas y desventajas de estos hongos así:

Ventajas:

- a) Presentan grados variables de especificidad, pueden ser específicos a nivel de familia o especies muy relacionadas. En el caso de las cepas, pueden ser específicas a nivel de especie, sin afectar a los enemigos naturales.
- b) Si el entomopatógeno encuentra las condiciones adecuadas para introducirse y colonizar un ecosistema, se reproduce y renueva en forma continua, es decir, se vuelve persistente, haciendo innecesarias nuevas aplicaciones.
- c) Se pueden aplicar mezclas de hongos entomopatógenos con dosis sub letales de insecticidas para lograr efectos sinérgicos superiores a los logrados con aplicaciones de cada producto por separado.
- d) No contaminan el medio ambiente ni afectan al hombre u otros animales superiores.
- e) Cuando el hongo no llega a causar la muerte directamente, se presentan efectos secundarios que alteran el normal desarrollo del ciclo de vida del insecto.

Desventajas:

- a) Sensibilidad a la variación de las condiciones climáticas como temperaturas extremas, desecación y luz ultravioleta. Estas limitantes están siendo contrarrestadas mediante el uso de aditivos (protectores solares, aceites, antidesecantes).
- b) Requieren de condiciones de almacenamiento más exigentes que las moléculas inorgánicas, para evitar que pierdan su patogenicidad.
- c) En general, los insecticidas biológicos no matan instantáneamente.
- d) Alcanzan buenos niveles de control entre una y tres semanas después de la aplicación, dependiendo de la plaga y del ambiente. Sin embargo, el insecto deja de ser plaga al ser parasitado por el hongo, deja de alimentarse mucho antes de morir, disminuyendo el daño.

2.3.3 Clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana*. La especie del género *Bauveria* son principalmente parásitos de insectos. Rodríguez, describe las

colonias de *Bauveria bassiana* de color blanco purpura y al envejecer se tornan de un amarillo pálido y uniforme. Monzon 2004)¹³.

La clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana* es la siguiente:

Clase: **Deuteromycetes**
 Orden: **Moniliales**
 Familia: **Moniliaceae**
 Género: **Bauveria**
 Especie: **Bauveria bassiana**

El hongo posee hifas septadas que forman conidióforos cortos, llevando fiálides simples o en grupo, cortos, con la base hinchada y generalmente termina en zigzag. Las conidias son uniceladas, hialinas y generalmente globosas.

2.3.4 Clasificación taxonómica de *Metarhizium anisopliae*.

Clase: **Deuteromycetes**
 Orden: **Moniliales**
 Familia: **Moniliaceae**
 Género: **Metarhizium**
 Especie: **Metarhizium anisopliae**

Forma sobre el insecto afectado un micelio polvoso de color verde, compuesto de conidióforos y conidias. Los conidióforos son cortos, septados, simples o con dos ramificaciones, llevando en los extremos fiálides simples o en grupos, con cadenas de conidias de nacimiento bacipetalo. Estas son ovoides, uniceladas, ligeramente pigmentadas o hialinas.

2.3.5 Modo de acción. La enfermedad producida por hongos se llama micosis. Tanada y Kaya (1993)¹⁴ mencionan que el desarrollo de la micosis puede ser separado en tres fases:

¹³ MONZON, A. 2004. Producción de hongos entomopatógenos. Nicaragua. CATIE 63 p.

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 (Samson, et al, 1988)¹⁵.

Los hongos, además, pueden infectar a los insectos a través de las aberturas corporales como son cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas. Las esporas pueden germinar rápidamente en estos ambientes por ser húmedos. Cuando lo hacen en los fluidos digestivos, pueden destruir a la hifa germinativa. En este caso, el insecto no muere de micosis sino a causa de las toxinas.

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 (Charnley, 1984)¹⁶ y estado de desarrollo del insecto. La digestión del integumento se produce mediante las enzimas (proteasas, aminopeptidasas, lipasas, estererasas y quitinasas). Cuando la hifa ha llegado al hemocele, se pueden producir diferentes reacciones de defensa del insecto frente a un cuerpo extraño: la fagocitosis, encapsulación celular y la formación de compuestos antimicrobianos como las lisozimas, aglutininas y melanización. En este caso, el hongo debe vencer el sistema inmunológico del hospedante antes de entrar a la hemolinfa y desarrollarse dentro del insecto.

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

¹⁴TANADA, Y; KAYA, H. 1993. Insect Pathology. San Diego, California, US. Academic Press. 666 p.

¹⁵ SAMSON, R.A., H.C. EVANS AND J.P. LATGÉ. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer, Verlag, Berlin.

¹⁶ CHARNLEY, A. 1984. Physiological aspects of destructive patogenesis in insects by fungi: A speculative review. In: Invertebrate-microbial interactions. Anderson, J., A. Rayner and D. Walton. Cambridge University Press. Cambridge. Pp 229-270.

multiplican y dispersan rápidamente, desarrollando protoplastos, elementos discretos ameboides, sin pared celular que no son reconocidos por los hemocitos del hospedante (Pérez, 2004)¹⁷ y produciendo micotoxinas (Tanada y Kaya, 1993)¹⁵. 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.

A continuación del crecimiento del hongo en el hemocele, se producen los síntomas fisiológicos del insecto afectado como convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos alterados (deja de alimentarse, reduce su movimiento), entra en un estado letárgico y finalmente muere, lo que puede ocurrir relativamente rápido o en unos cuantos días. Ocurre una competencia entre el hongo y la flora intestinal. Los hongos pueden producir sustancias antibacterianas que alteran la coloración del cadáver (Ferrón, 1978)¹⁸. Con la muerte del insecto termina el desarrollo parasítico del hongo y empieza la fase saprofítica: el hongo crece en el hemocele formando masas micelianas que salen al exterior fundamentalmente por las regiones intersegmentales –esporulando sobre el cadáver y produciendo inóculo para infectar a otros insectos y por las aberturas naturales (espiráculos, boca y ano). La gran dependencia de la humedad es el mayor factor limitante que presentan los hongos, ya que para que se produzca la germinación y esporulación fuera del hospedante se requieren valores de humedad relativa superiores a 90%.

2.3.6 Utilización de hongos en el control de insectos. La habilidad de este aislado para penetrar la cutícula de garrapatas adultas y la duración del proceso de invasión total que para este caso fue entre el noveno y catorceavo día postinoculación, podría permitir en campo que garrapatas infectadas inoculen a las no infectadas (Beltrán & col, 2008)².

El primer trabajo de control microbiano fue realizado por Metschnikoff en 1879. Siguiendo estas legaciones en 1884 fueron producidos 55 Kg. del hongo *M. anisopliae*, para el control de larvas del curculiónido *Cleonus punctiventris*, Germen, con el cual se obtuvo un control de 55 a 80% de insectos en pequeñas áreas, después de 10 a 15 días de la aplicación (Martignoni 1968). Begun Alves

¹⁷PÉREZ, C.N. 2004. Manejo Ecológico de Plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural – CEDAR.296 pp

¹⁸ FERRON, P. 1978. Biological control of insect pest by entomopathogenous fungi. In: Annual review of entomology. 23:409-442.

(1986), ese patógeno ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de los diferentes órdenes incluyendo plagas importantes.

EL hongo *Beauveria bassiana* de acuerdo con Macleod, (1954), fue aislado de insectos muertos con mayor frecuencia que cualquier otro entomopatógeno y Alves (1986) informa que este hongo infecta cerca de 200 especies de insectos. Uno de los primeros ensayos de control microbiano fue hecho en 1893, cuando el mismo fue evaluado contra larvas de *Lymantria monarcha*.

M. anisopliae presentó una alta capacidad para atacar las garrapatas, puesto que aun en las concentraciones más bajas utilizadas afectó diferentes estados de desarrollo de este ectoparásito sobre los bovinos o en el pasto. Además, *M. anisopliae* causó disminución en la oviposición de garrapatas provenientes de vacas tratadas y en la eclosión larvaria, lo que podría ser interpretado como la transmisión vertical del efecto controlador del hongo a la descendencia del artrópodo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN

El ensayo se realizó en las instalaciones de los laboratorios de la clínica veterinaria ALBERTO MARTÍNEZ de la universidad de Nariño.

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Recolección de garrapatas en campo. Se recolectaron 240 garrapatas en estado adulto (Teleóginas, con un largo de 4 a 8 mm) del ganado de la finca del señor Alberto Noguera en la vereda de Chapacual municipio de Yacuanquer. La recolección se realizó manualmente, desprendiendo las garrapatas con el dedo índice y pulgar, evitando dañar el hipostoma de las mismas y se procedió a su identificación como *Boophilus microplus* utilizando las claves taxonómicas recopiladas por Benavides y López 2005¹⁹. Ver anexos (s.f.).

Figura 1. Recolección de garrapatas



Fuente: esta investigación.

¹⁹ BENAVIDES, E; LOPEZ, G. 2005. Clave Pictórica para la Identificación de Garrapatas en Colombia y Norte de Sudamérica. Disponible en línea <http://www.corpoica.org/> (link: redes: redectopar)

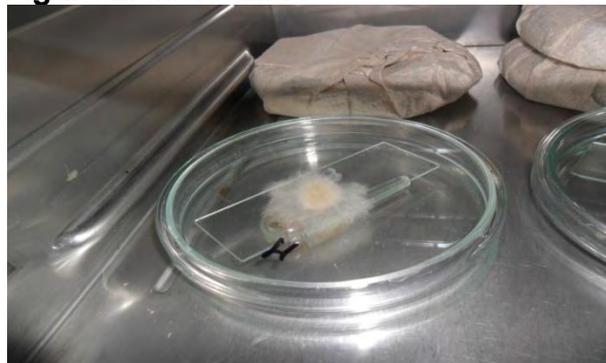
Las garrapatas se depositaron y se transportaron en tubos de ensayo con tapa de algodón hasta el laboratorio de la clínica veterinario ALBERTO MARTINEZ de la Universidad de Nariño.

3.2.2 Activación de la virulencia del hongo *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. El inóculo de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* se consiguió a partir de los productos comerciales de BOVETROPICO® y METATROPICO®, respectivamente, que contienen esporas liofilizadas de estos hongos entomopatógenos. Para la activación de la virulencia de estos microorganismos, se inocularon garrapatas con los productos liofilizados y se incubaron en cámaras húmedas a temperatura ambiente por 15 días.

A partir del crecimiento micelial que se obtuvo de los insectos, se tomó una muestra con un asa estéril y se sembró en agar Saboureaud acidificado. Para acidificar el medio, se lo esterilizó agregando 1 ml de ácido sulfúrico 0.5 N por cada 100 ml de medio con una pipeta estéril. Se incubó por 15 días a temperatura ambiente. Del crecimiento del hongo en la caja petri, se realizó una identificación microscópica de la morfología de los hongos teniendo en cuenta la descripción que realiza Sañudo *et al* 2001²⁰, utilizando la técnica del microcultivo.

El microcultivo se realizó esterilizando una caja petri que contiene un soporte de vidrio y un portaobjetos. Sobre el portaobjetos se depositó una rodaja de agar saboureaud cortado con un sacabocados estéril, posteriormente, se colocó un cubreobjetos. Luego se inoculó el hongo en el perímetro del disco de agar y se incubó a temperatura ambiente por 15 días. El cubreobjetos se tiñó con azul de lactofenol y se observó la microestructura del hongo en el microscopio.

Figura 2. Microcultivo



Fuente: esta investigación

²⁰ SAÑUDO, B; 2001. Control biológico de plagas y enfermedades. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto, 47p.

Los aislamientos se sembraron en un tubo de ensayo taparrosca con agar saboureaud para su almacenamiento.

3.3 PRUEBA DE VIRULENCIA

3.3.1 Desinfección de garrapatas. Las garrapatas colectadas se desinfectaron en una solución de hipoclorito 0.1% por un minuto y se lavaron con agua destilada estéril hasta eliminar completamente el hipoclorito.

Luego se pasaron las garrapatas a una cámara húmeda sosteniéndolas con una pinza estéril. La cámara húmeda se preparó colocando una mota de algodón en el fondo de las cajas petri, esterilizándolas en el horno a 150°C por 2 horas. En cada cámara húmeda se colocaron 10 garrapatas de tamaño homogéneo e igual fase de desarrollo biológico.

3.3.2 Preparación del inóculo. Se sembró el hongo *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en cajas petri con agar saboureaud y se incubaron por 15 días a temperatura ambiente.

Para determinar la concentración del inóculo, se lavó con 5 ml de agua destilada estéril el micelio del hongo producido y se recolectó en un beaker estéril. Se determinó la concentración de esporas del hongo en este volumen de agua realizando un conteo en la cámara de Neubauer con la ayuda de un piano, de la siguiente manera:

Con unos goteros plásticos se tomó la muestra y se aplicó una gota en la ranura de la cámara. Se contaron las conidias del hongo en 5 cuadrados secundarios del cuadrante E central de la cámara, este valor se dividió, se multiplica 5 por 5

$$\text{N}^\circ \text{ conidias/ml} = \frac{\text{N}^\circ \text{ totales de conidias contadas en 5 cuadrados secundarios} \times 25}{\text{x } 10.000} =$$

5

3.3.3 Inoculación de las garrapatas. Para evitar aglomeración de las conidias por la tensión superficial en el agua destilada estéril, se agregó 3 gotas de Twin 80.

Se realizó por inmersión de las garrapatas durante 1 minutos en el inóculo preparado con unas concentraciones de 1×10^8 conidias/ml, 1.25×10^9 conidias

ml y 2.25×10^{10} conidias/ml (reportadas por Arguedas, Alvarez y Bonilla 2008)²¹. Se colocó 40 garrapatas en un tubo de ensayo estéril y se agregó el inóculo. Al cabo de 1 minutos se vació el inóculo junto con las garrapatas en la cámara húmeda, colocando 10 garrapatas por cámara húmeda y sellando las cajas petri con papel parafilm y rotuladas. Se incubaron estas cámaras por 15 días a temperatura ambiente.

3.3.4 Determinación del porcentaje de mortalidad. La mortalidad de los insectos se evaluó con la fórmula de Abbot:

$$\% \text{ de mortalidad corregida} = \frac{\% \text{ de mortalidad tratamiento} - \% \text{ de mortalidad testigo}}{100 - \% \text{ mortalidad testigo}} \times 100$$

Observación: Después de la inoculación se realizaron dos observaciones, la primera a los siete días y la segunda a los 14 días después de la inoculación. Se contabilizaron las garrapatas muertas. Una vez evaluadas las garrapatas, los platos fueron sellados nuevamente. Al finalizar las evaluaciones, las garrapatas que tuvieron esporulación fueron usadas para realizar nuevos aislamientos y verificar bajo al microscopio que las garrapatas estuvieran contaminadas con los hongos en mención.

3.3.5 Tratamiento. Se utilizaron dos hongos entomopatogenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y un testigo con agua.

Cuadro 1. Concentraciones para la aplicación de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*

Tratamientos	Conidias/mL
<i>Bauveria Bassiana</i>	1×10^8
	$1,25 \times 10^9$
	$2,25 \times 10^{10}$
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1×10^8
	$1,25 \times 10^9$
	$2,25 \times 10^{10}$
Testigo	Agua

²¹ ARGUEDAS, M ; ÁLVAREZ, V; BONILLA, R.2008. Eficacia del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en el control de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Disponible en línea: www.mag.go.cr/rev_agr/inicio.htm

3.4 VARIABLES MEDIDAS

- Porcentaje de mortalidad corregida: la mortalidad se midió contando el número de garrapatas muertas desde los siete días hasta los 14 días.

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se trabajó con dos experimentos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*), bajo una distribución irrestrictamente al Azar (DIA), con cuatro repeticiones por tratamiento (tres concentraciones de conidias por ml). Los datos obtenidos se interpretaron estadísticamente con un análisis de varianza y la prueba de significancia de Tukey. El nivel de significancia fue de 0.05.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) bifactorial, para las variables número de garrapatas muertas. El nivel de significancia exigido fue de 0.05. Se utilizó el programa estadístico "Statistical Analysis System" (SAS 2001).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez montados los ensayos, se realizó un seguimiento descriptivo de las garrapatas, los primeros síntomas comenzaron a observarse a partir de cuarto al quinto día post inoculación, observándose inmovilidad e hinchamiento. Después del día 14 se observa estallamiento de algunas garrapatas y al día 15 comienza el crecimiento micelial en las garrapatas muertas.

Figura 3. Mortalidad de garrapatas



Fuente: Esta investigación

4.1 Mortalidad

La concentración que mayor mortalidad ocasiono fue la de 1×10^8 , al resto de los tratamientos. Presentando diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$). El testigo presento un porcentaje de mortalidad nulo o cero

Cuadro 2. Mortalidad de garrapatas

Tratamiento	Conidias/mL	Mortalidad % de garrapatas muertas
	1×10^8	90
<i>Bauveria Bassiana</i>	$1,25 \times 10^9$	49,5
	$2,25 \times 10^0$	80

	1 x 10 ⁸	90
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1,25 x 10 ⁹	80
	2,25 x 10 ¹⁰	40
Testigo absoluto	Agua	0

La variable mortalidad se estudió mediante análisis de varianza bifactorial teniendo en cuenta como factores como; especie y la concentración del hongo.

De acuerdo con el análisis estadístico existen diferencias significativas entre especies e igualmente entre dosis, por lo tanto se procedió a realizar la prueba de comparación múltiple de tukey, para los efectos principales (dosis y especie).

Cuadro 3. Análisis de varianza para la evaluación de dos hongos *Bauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

Fuente	DF	Sum. de Cuadr.	Cuadr. de la media	Pr > F
Modelo	5	9220,833333	1844,166667	*** <.0001
Especie	1	60,166667	60,166667	*** 0,0001
Dosis	2	4160,333333	2080,166667	*** 0,0001
Interacción	2	5000,333333	2500,166667	0,0501
Error	18	47,000000	2,611111	
Total correcto	23	9267,833333		

R- cuadrado	Coef Var
0,9949	2,2574

*** Diferencias significativas

Se puede observar que la media de la especie **BB**, es mayor estadísticamente que la media **MA** (letras distintas)

Cuadro 4. Evaluación estadística entre especies

Tukey	Media	Nº de obs.	Especie	
A	73,1667	12	BB	bauveria bassiana
B	70,0000	12	MA	metarhizium anisopliae

Por otra parte las dosis son diferentes estadísticamente, ya que representan letras distintas, se puede observar que la dosis D1 ($1 \cdot 10^8$), tiene una mortalidad superior a las dosis D2 y D3, mientras que la dosis D2 es mayor a la D3.

Cuadro 5. Evaluación estadística de mortalidad de garrapatas con tres concentraciones de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*

Tukey	Media	Nº de obs.	Dosis	
A	90,0000	8	D1	($1 \cdot 10^8$)
B	64,7500	8	D2	($1,25 \cdot 10^9$)
C	60,0000	8,00	D3	($2,25 \cdot 10^{10}$)

5. CONCLUSIONES

Los dos hongos; *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, presentaron actividad patogénica e infectan de manera efectiva a la garrapata del género *Boophilus microplus* en evaluaciones de laboratorio.

En el laboratorio, los mejores resultados de mortalidad se obtuvieron con las concentraciones de 1×10^8 *Beauveria bassiana* (BOVETROPICO®) y *Metarhizium anisopliae* (METATROPICO®), observándose una alta capacidad para infectar a las teleogéninas.

A pesar que los dos hongos estudiados presentaron patogenicidad contra la garrapata (*Boophilus Microplus*), se ha encontrado diferencias estadísticas entre la mortalidad causada por las diferentes concentraciones y las dos especies de hongos.

Los productos biológicos tiene la ventaja, que pueden ser aplicados sin restricciones de tiempo, contrario a los productos químicos que tienen un tiempo de retiro; además, son una opción para los ganaderos interesados en tener una producción libre de productos químicos y aquellos que buscan las certificaciones en buenas prácticas ganaderas.

6. RECOMENDACIONES

Evaluar la viabilidad y persistencia del hongo en las praderas en diferentes épocas de año.

Evaluar la patogenicidad de los hongos en otros géneros de garrapata

Realizar un análisis económico del control y manejo de las garrapatas, con la utilización de hongos entomopatógenos en condiciones de campo.

Modo de preparación:

Realizar una suspensión de 2 gramos por litro, en un balde nuevo, dejar reposar por dos horas, luego filtrar y realizar la aplicación de 4 litros por animal.

Método de aplicación:

Se debe aplicar en todo el cuerpo del animal, en una suspensión de 1×10^8 conidios/ml, con brocha, bomba de espalda, esta debe ser nueva, ya que si esta usada, está contaminada y esto puede afectar la viabilidad de los hongos.

Cualquiera que sea el método que se utilice para bañar a los animales, es requisito que estos queden bien mojados y sobre todo en las zonas de la ubre, periné y cola, así como en las axilas y la cabeza, sobre todo las orejas.

La aplicación debe ser en horas de baja actividad solar debido a la acción de las radiaciones solares y las altas temperaturas sobre las esporas.

En cuanto al intervalo entre tratamientos, desde un punto estrictamente técnico y tomando sólo en cuenta la especie de garrapata de acuerdo a su ciclo evolutivo, este intervalo debe ser de cada 21 días para *Boophilus microplus*

Realizar un manejo integrado de la garrapata que consiste en:

Efectuar rotación de potreros; ya que en Colombia se ha obtenido un promedio de tiempo de sobrevivencia de larvas de *B. microplus* de cuatro a seis semanas durante la época de verano o sequía. Esto significa que mientras más tiempo de descanso se le dé a los potreros, mayor será la mortalidad de larvas y en consecuencia menor será el número de larvas disponibles dentro de la población de garrapatas a parasitar a los bovinos.

Labores de preparación y/o conservación de potreros; la utilización de implementos de labranza tales como arados, rastras, etc. en labores agrícolas conllevan a una modificación de las condiciones microclimáticas del suelo por un

tiempo perentorio. La variación del microhabitat de las garrapatas debido a labores culturales agrícolas, va a traer como consecuencia un efecto negativo en la dinámica poblacional de las garrapatas con la subsiguiente disminución de la población debido a la exposición directa al medio ambiente de los estadios de vida libre de las garrapatas, y en especial de las larvas.

La poda de los pastos después del pastoreo; crea también una situación de espacio abierto y desprotegido contra los rayos solares para las garrapatas y en especial contra las larvas, lo que incrementa su mortalidad por efecto de la alteración del equilibrio electrolítico y en el gradiente de evapotranspiración.

7. BIBLIOGRAFÍA

-----, 2006; Publicación de Laboratorios Virbac México, No. 45, Mayo 2006.

-----, 2008. Manual Bayer de la garrapata. Disponible (en línea): www.tupeluqeriacanina.com.

ARGUEDAS, M ; ÁLVAREZ, V; BONILLA, R.2008. Eficacia del hongo entomopatógeno *Metharrizium anisopliae* en el control de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Disponible en línea: www.mag.go.cr/revagr/incio.htm

BELTRÁN, C; GUTIÉRREZ, A.I.; SALDARRIAGA, Y. 2008. Patogenicidad de *Lecanicillium lecanii* (Fungi) sobre la garrapata *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) en laboratorio. Rev. Colombiana. Entomología.v.34, n.1, Bogotá, ene./jun.2008.

BENAVIDES O., E. 2001. Control de las pérdidas ocasionadas por los parásitos del ganado. Carta Fedegan N° 69, julio - agosto, (Anexo coleccionable "Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en explotaciones ganaderas 6"), p. 52-63.

BENAVIDES, E; LOPEZ, G. 2005.Clave Pictórica para la Identificación de Garrapatas en Colombia y Norte de Sudamérica. Disponible en línea <http://www.corpoica.org.co/> (link: redes: redectopar.).

BETANCOURT, E. 1993. Susceptibilidad de varias cepas de la garrapata *Boophilus microplus* a diferentes acaricidas. *Revista El Cebú*. 22: 53-55.

BETANCOURT, J. A.; CASSALETT, E.; ESCOBAR, A.; URIBE, L. 1999. Experiencias con mezclas de compuestos acaricidas: susceptibilidad y alternativas de control de las garrapatas. *Agricultura de las Américas*. Primera entrega. 272: 31 – 34.

CAÑEDO, V; AMES, T; 2004 Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú; Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, p 6.

CASTELLANO G. F. L 1990. Estudio de la Efectividad Garrapaticida del Compuesto Cypergan 15 en las Razas Aberdeen Angus y Brahman en el Departamento de Boaco, Nicaragua. Tesis (Ing Agr) Managua Nicaragua 44p.

CHARNLEY, A. 1984. Physiological aspects of destructive patogénesis in insects by fungi: A speculative review. In: Invertebrate-microbial interactions.

Anderson, J., A. Rayner and D. Walton. Cambridge University Press. Cambridge. Pp 229-270.

COLCIENCIAS. 2003. Nueva vacuna de Limor de Colombia contra las garrapatas. Disponible (en línea): www.colciencias.gov.co/agenda/pn137.html.

ESPAINÉ, L. LINES, R. 1983. Manual de Parasitología y Enfermedades Parasitaria I. Instituto Superior de Ciencias Agropecuaria, Habana, Cuba 557 p.

ESPINOZA SILVA, L. 2005. Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en control biológico de *Boophilus microplus*. Tesis Ing. Agr. Honduras. Zamorano. 16 p.

ESPINOZA, L.R. 2005. Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y de *Metarhizium anisopliae* en control biológico de *Boophilus microplus*. Honduras Tesis (Ing. Agr) zamorano. Honduras 17 p.

FAO. 2005. Departamento de Agricultura. Resistencia a los antiparasitarios; estado actual con énfasis en América Latina. Disponible (en línea): www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/006/Y4813S/y4813s03.htm.

FERRON, P. 1978. Biological control of insect pest by entomopathogenous fungi. In: Annual review of entomology. 23:409-442.

MARTINS, R.M.; GONZÁLEZ, F.H.D.2007; Uso del aceite de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) (Panicoidideae) como acaricida frente a la garrapata *Boophilus microplus* Canestrini (Acari:Ixodidae).Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.9, n.4, p.1-8, 2007.

MONICA, J. CHRISTENSEN, F. FARBER, M 2008. Garrapata de los bovinos: Una amenaza de ocho patas para el ganado del NOA rev. *Salta Productiva, Año V, No. 25, Diciembre 2008*.

MONZON, A. 2004. Producción de hongos entomopatógenos. Nicaragua. CATIE 63 p.

MORENO, R.; HERNÁNDEZ, F.; BENAVIDES, E.; COTES, A.M.; ROMERO, A.; GÓMEZ, M.I.; & GARCÍA, L.P. 2001. Evaluación in vitro de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii* para el control de la garrapata *Boophilus microplus* (Canestrini) (Mestastigmata: Ixodidae). En: "Resúmenes XXVIII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, SOCOLEN". Pereira, Colombia, 8-10 de agosto de 2001. SOCOLEN: 43.

PÉREZ, C.N. 2004. Manejo Ecológico de Plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural – CEDAR.296 p.

RODRIGUEZ, Dora. Control microbiológico del gusano blanco de la papa *premnoripex vorax* (Coleoptero: Cucurlionidae). En: XII Congreso de la sociedad Colombiana de Entomología. Resúmenes. Medellín, SOCOLEN.1975. 58P.

RIJO, C. E.; NAVARRO, G.; RODRÍGUEZ, R. M.; MURILLO, E. Y. 1998. Efectividad de *Verticillium lecanii* sobre la fase parasítica de la garrapata *Boophilus microplus* (Acari: Metastigmata: Ixodidae). Revista Colombiana de Entomología 24 (1-2): 67-69.

SAMSON, R.A., H.C. EVANS AND J.P. LATGÉ. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer, Verlag, Berlin.

SAÑUDO, Benjamin. Control biológico de plagas y enfermedades. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto, 2001. 47p.

SAÑUDO, Benjamin; CASTILLO, Guillermo. Papel de los microorganismos en el control biológico de plagas. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto, 1994. 67p.

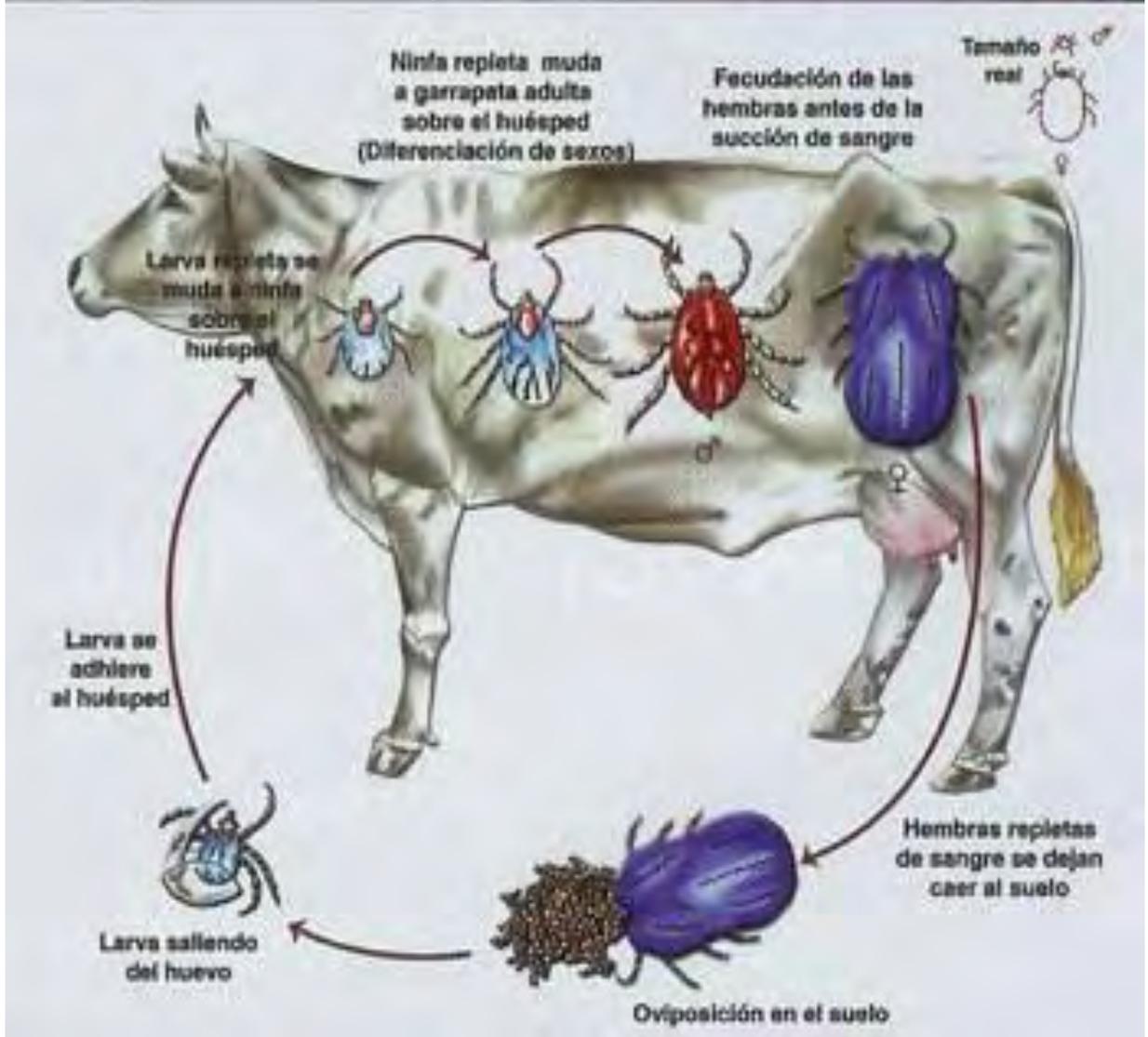
TANADA, Y; KAYA, H. 1993. Insect Pathology. San Diego, California, US. Academic Press. 666 p.

ANEXOS

Anexo A. Garrapata del genero *Boophilus Microplus*

Tomado de: Clave Pictórica para la Identificación de Garrapatas en Colombia y Norte de Sudamérica.

Anexo B. Ciclo de vida de *Boophilus microplus*.



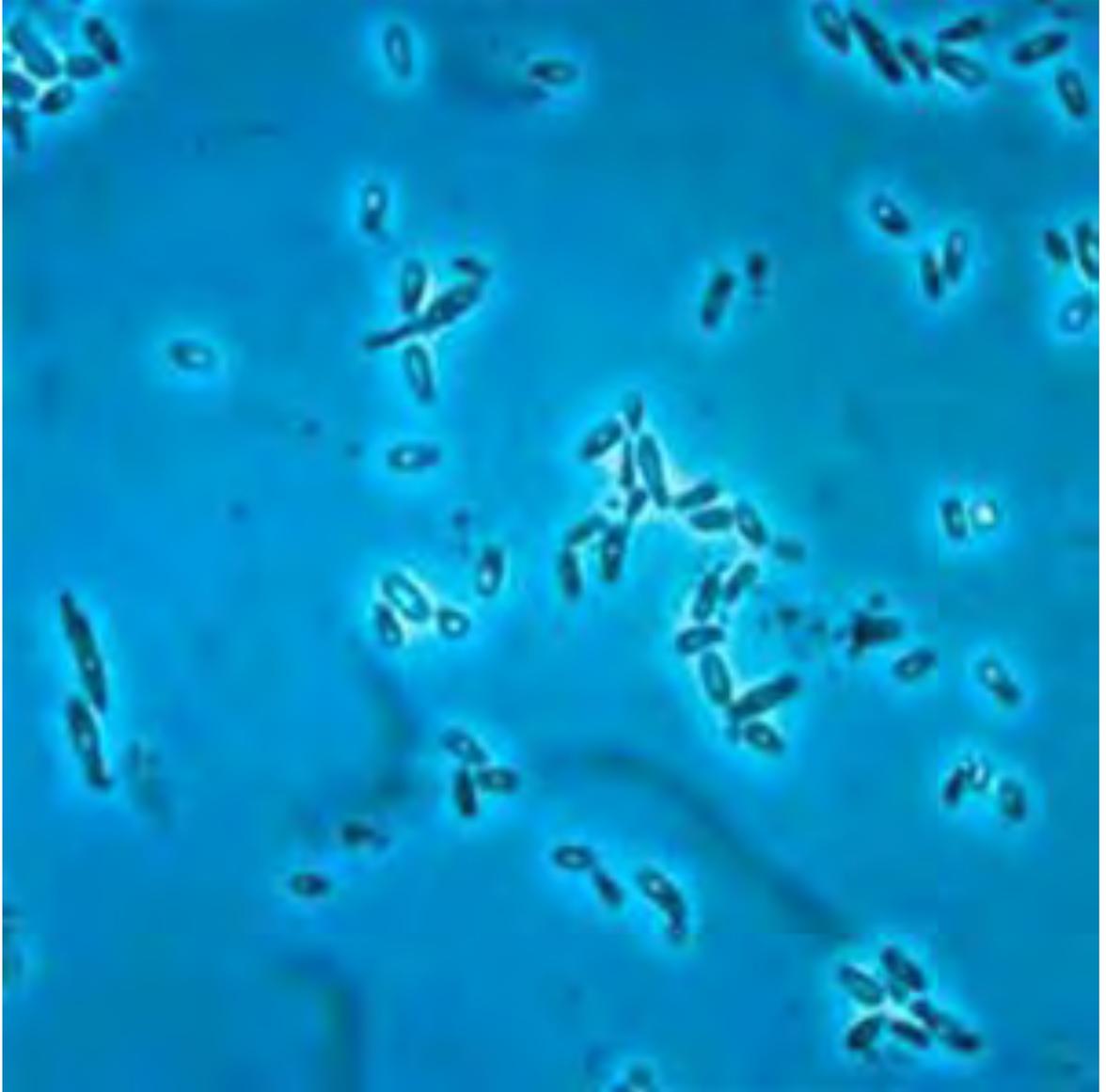
Tomado de: revistacebu.com/articulos%20enero/control_archivos/image004.jpg

Anexo C. Colonia de *Bauveria bassiana*.



Fuente: Esta investigación.

Anexo D. *Esporas Bauveria bassiana*



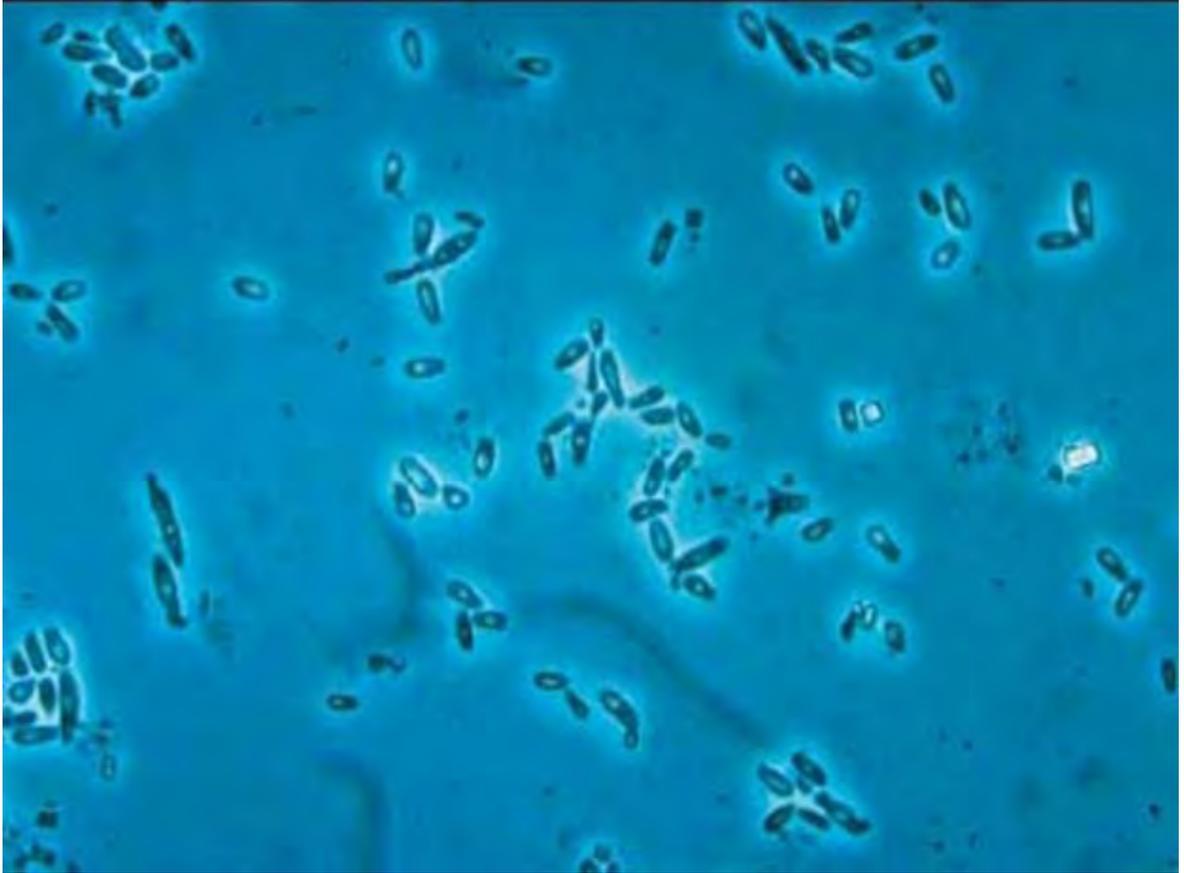
Fuente: Esta investigación.

Anexo E. Colonia de *Metarhizium anisopliae*.



Fuente: Esta investigación.

Anexo F. Esporas de *Metarhizium anisopliae*



Fuente: Esta investigación.