

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

EFFECTO DE DOS AISLADOS DE *Beauveria bassiana* Y UNO DE *Metarhizium anisopliae* SOBRE *Boophilus microplus* EN LABORATORIO Y CAMPO.

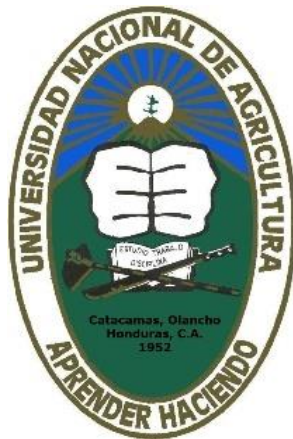
POR:

LUIS FELIPE IZAGUIRRE ORELLANA

TESIS

**PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

INGENIERO AGRÓNOMO



CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C. A.

DICIEMBRE, 2013

**EFFECTO DE DOS AISLADOS DE *Beauveria bassiana* Y UNO DE *Metarhizium anisopliae*
SOBRE *Boophilus microplus* EN LABORATORIO Y CAMPO.**

POR:

LUIS FELIPE IZAGUIRRE ORELLANA

**M.Sc Raúl Muñoz.
Asesor Principal**

TESIS

**PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

INGENIERO AGRÓNOMO

CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C. A.

DICIEMBRE, 2013

DEDICATORIA

A MI DIOS todo poderoso el rey de reyes, por estar conmigo siempre en todo momento de mi vida y siempre brindándome sabiduría.

A MIS PADRES, SARA MARIA ORELLANA Y LUCIO IZAGUIRRE RIVERA, por su apoyo incondicional, por estar ahí siempre cuando los necesitaba, por ser ejemplos en mi vida a seguir y por su confianza depositada en mí, los amo.

A MIS HERMANOS: GABY YANETH, EVER JOSUE por ser un ejemplo en mi vida y a mis hermanos pequeños JARET OBET y JAFET que los amo mucho.

AGRADECIMIENTOS

Total agradecimiento para DIOS por siempre estar conmigo con mi familia, por permitirme conocerlo y ser un hijo de él.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA, por darme la oportunidad de estudiar y vivir durante estos cuatro años y por todos esos buenos momentos.

A mi asesores de tesis M. Sc. Raul Muñoz y M. Sc Orlando Castillo por haberme permitido realizar mi investigación y por su comprensión brindada, apoyo y tiempo.

Al encargado del laboratorio de hongos entomopatogenos Douglas Hernández por su apoyo en todo momento en la realización del trabajo.

A mis compañeros de cuarto Dorian, Raúl, Ede, Gerson, David y Luis Rodriguez un amigo sincero y que me dio su mano ante situaciones difíciles, a Sofía y Osa por estar ahí apoyándome en todo momento las amo mucho.

CONTENIDO

ACTA DE SUSTENTACIÓN.....	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
CONTENIDO	iv
LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ANEXOS.....	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	1
2.1 General	1
2.2 Específicos	1
III. REVISION DE LITERATURA	4
3.1 Las garrapatas (<i>Boophilus microplus</i>).....	4
3.1.1 Generalidades	4
3.1.2 Taxonomía	5
3.1.3 Anatomía	5
3.1.4 Ciclo biológico	6
3.1.5 Fase por la que pasa <i>Boophilus spp.</i>	7
3.1.6 Daños que ocasiona	10
3.2 Hongos entomopatógenos	11
3.2.1 Descripción de <i>Beauveria bassiana</i>	11
3.2.2 Descripción de <i>Metarhizium anisopliae</i>	12
3.2.3 Modo de acción	12
3.2.4 Adhesión de la espora a la cutícula del hospedero y germinación	12
3.2.5 Penetración en el hemocele	13

3.2.6 Replicación en el hemocele	14
3.3 Resultados de investigación sobre la eficiencia de los hongos entomopatógenos en el control de plagas.	14
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 Ubicación de la investigación a nivel de laboratorio	17
4.2 Materiales y equipo.	17
4.3 Manejo del experimento.....	18
4.3.1 Asepsia.....	18
4.3.2 Lavado	18
4.3.3 Esterilización	18
4.3.4 Desinfección del ambiente (laboratorio y almacenamiento).	19
4.3.5 Medio de cultivo PDA-SDA.....	20
4.4 Manejo del inóculo.....	20
4.4.2 Aislamiento y reproducción.....	20
4.4.3 Aislamiento directo.....	21
4.5 Evaluación de rendimiento y viabilidad.....	21
4.5.1 Rendimiento de conidias / ml de solución.....	22
4.5.2 Viabilidad	23
4.6 Producción de garrapatas en laboratorio.	23
4.7 Variables evaluadas en laboratorio	25
4.7.1 Mortalidad provocada por las cepas	25
4.7.2 Determinación del tiempo letal medio (TL50)	25
4.7.3 Tiempo de colonización y número de garrapatas parasitados	26
4.8 Evaluación a nivel de campo.....	26
4.8.1 Ubicación del experimento	26
4.8.2 Diseño experimental y tratamientos evaluados	26
4.8.4 Aplicación de los tratamientos	27
4.8.5 Variables evaluadas	28
V. RESULTADOS Y DISCUSION	30
5.2 Determinación de TL 50	31
5.3 Tiempo de colonización y número de larvas parasitadas.	33

5.4 Variable evaluada en campo.	34
VI. CONCLUSIONES	30
VII. RECOMENDACIONES	30
VIII. BIBLIOGRAFIA	38
ANEXOS	43

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción y dosificación de los tratamientos.....	24
Cuadro 2. Descripción, dosificación y frecuencia de aplicación de los tratamientos a nivel de campo.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mortalidad diaria acumulada de larvas de <i>Boophilus microplus</i> , causada por los hongos entomopatogenos.	30
Figura 2. Mortalidad diaria acumulada de larvas de <i>Boophilus microplus</i> , causadas en laboratorio por los hongos entomopatogenos.	32
Figura 3. Sobrevivencia acumulada de <i>Boophilus microplus</i> en estado adulto (Teologina) presentada por los tratamientos.....	34

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Formato de toma de datos para mortalidad larval y presencia de micelio del hongo, bajo condiciones de laboratorio. N° día.....Fecha..... Nombre del muestrador.....	44
Anexo 2. Mortalidad de ninfas y adultos de <i>Boophilus microplus</i> sobre los hospederos.....	45
Anexo 3. Distribución espacial de los tratamientos en laboratorio	46
Anexo 4. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable mortalidad de larvas día 1.....	46
Anexo 5. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable mortalidad de larvas día 2.....	46
Anexo 6. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable mortalidad de larvas día 3.....	47
Anexo 7. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable mortalidad de larvas día 4.....	47
Anexo 8. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable mortalidad de larva día 5.	47
Anexo 9. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable mortalidad de larvas día 6.....	48
Anexo 10. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable mortalidad a nivel de campo.....	48

Izaguirre Orellana L. 2013. EFECTO DE DOS AISLADOS DE *Beauveria bassiana* Y UNO DE *Metarhizium anisopliae* SOBRE *Boophilus microplus* EN LABORATORIO Y CAMPO, Tesis Ing. Agr. Universidad Nacional de Agricultura. Catacamas, Olancho, Honduras C.A. 48 pp.

RESUMEN

La investigación se realizó en dos fases: A) una en laboratorio para determinar la patogenicidad de las cepas de *Beauveria bassiana* de Honduras (T1), *B. bassiana* (*Rhyssomathus*) (T2) proveniente de México, *Metarhizium anisopliae* de BATOVI, Uruguay (T3) y un testigo asperjado con agua destilada (T4), se expusieron 400 larvas de garrapatas (*Boophilus microplus*), las que fueron obtenidas a través de huevos ovipositados en laboratorio por garrapatas adultas. Por cada tratamiento se utilizaron 100 larvas distribuidas en tubos de ensayo. Se realizó un proceso de inmersión durante 10 segundos para impregnar las larvas con el entomopatógeno a una concentración de 1×10^8 conidios/ml. Se realizaron lecturas de mortalidad durante ocho días. En esporulación se realizaron lecturas post muerte hasta observar el inicio de crecimiento de micelio. Se utilizó el diseño DCA con cuatro tratamientos, diez repeticiones y diez observaciones, por cada lectura se realizó un ANAVA y una prueba de medias de DUNCAN, con el paquete estadístico INFOSTAT. Las variables evaluadas fueron: mortalidad diaria, tiempo letal medio (TL_{50}), tiempo de esporulación. Los resultados muestran que de 100 larvas inoculadas por tratamiento a los 12 días después el T1 mató el 39 %, T2 el 68 % y T3 el 13 %, para la variable TL_{50} se hicieron observaciones durante 12 días y solo el T2 alcanzó mortalidad del 50 % de larvas inoculadas a los seis días. La esporulación fue observada en los tres tratamientos, iniciando a los tres días para el T3 y a los cuatro días para el T2 y T1, en el testigo (T4) no hubo mortalidad ni esporulación. La cepa que en laboratorio presentó el mejor control de *Boophilus microplus* fue *B. bassiana* (*Rhyssomatus*) (T2). B) Fase de campo: realizada en la época de invierno correspondiente a los meses de julio a septiembre. Se evaluó dos cepas patógenas (*B. bassiana* (H4) y *B. bassiana* (*Rhyssomatus*)) estas aplicadas a una concentración de 1×10^8 conidios/ml asperjando por vaca la cantidad de 2.2 litros, se utilizó ganado holstein, pardo y jersey de la Universidad Nacional de Agricultura, con una infesta de 20 o más garrapatas por animal, realizando tres muestreos en el escudo de la ubre (mayor incidencia). Los tratamientos fueron *B. bassiana* (H4) (T1, frecuencia de 7 días), *B. bassiana* (H4) (T2, frecuencia de 14 días), *B. bassiana* (*Rhyssomathus*) (T3, frecuencia 7 días), *B. bassiana* (*Rhyssomathus*) (T4, frecuencia 14 días) y un testigo relativo (amitraz al 12.5%, T5) aplicando mediante un baño de aspersión. Se utilizó el diseño DCA con cinco tratamientos y tres repeticiones, para cada muestreo se realizó un análisis de varianza y pruebas de medias (Duncan) al 0.05%. Se hicieron dos aplicaciones para los tratamientos biológicos y una para el testigo relativo, La variable evaluada fue sobrevivencia de las garrapatas (teologina). Los ANAVA indican que hubo diferencia significativa y la prueba de medias nos dice que el tratamiento químico fue el que redujo la incidencia de garrapatas adultas (Teologina), y que ninguno de los biológicos fueron capaces de reducir la incidencia de la plaga.

Palabras claves: Hongos entomopatógenos, Control biológico, garrapatas, ganado bovino.

I. INTRODUCCION

Las enfermedades que transmiten las garrapatas, son una de las principales limitantes de la explotación de bovinos en el mundo (Bendeck 2012). El problema depende de la región, especies de garrapata presentes, agente transmisor, así como de la situación socioeconómica y el avance tecnológico en la aplicación de las medidas de control y el uso indiscriminado de pesticidas en garrapatas ha contribuido al desarrollo de resistencia, lo cual hace de este un proceso evolutivo que aparece por selección genética, estas en su estadio de ninfas son las que contribuyen en mayor medida a la transmisión de enfermedades, sobre todo babesiosis y anaplasmosis, las cuales producen importantes pérdidas en los sistemas de producción ganaderos (Márquez 2003). Otras enfermedades que pueden transmitir estos organismos son: la borreliosis (fiebre recurrente endémica, enfermedad de Lyme), rickettsiosis (fiebre botonosa, fiebres maculadas), ehrlichiosis, tularemia y viriasis (López 2005, citado por Bendeck 2012).

El principal método de control de las garrapatas es la aplicación de garrapaticidas 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 (Samish 2004, citado por Aguilar 2010).

El control biológico, 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. Dentro de estos, *Metarhizium anisopliae* y *Bauveria bassiana* son los hongos que han demostrado mayor patogenicidad contra *R. microplus* bajo condiciones de laboratorio y de campo (Aguilar 2010).

M. anisopliae es un anfitrión de una amplia gama de deuteromicetos entomopatógenos, reconocido por primera vez como un candidato potencial para el control biológico de plagas agrícolas en la

década de 1880. El hongo invade activamente los hospederos a través de la cutícula por la presión mecánica, debido a la formación de apresorios y degradación por la acción sinérgica de las enzimas hidrolíticas tales como proteasas, quitinasas y lipasas. 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. Los hongos entomopatógenos son controladores biológicos efectivos de muchas plagas, entre ellas las garrapatas y no tiene los problemas asociados con el uso de productos químicos (Fernández 2006).

Investigaciones realizadas en varios países, indican que contra las garrapatas, hay unos hongos entomopatógenos que pueden servir como sustitutos de los amitraz, sin embargo se necesita realizar estudios para optimizar la dosis y así obtener un mejor control.

Considerando otros métodos de control como alternativas de control sobre las garrapatas, esperamos a través de la presente investigación realizar un estudio para optimizar las frecuencias de aspersión de los controladores biológicos (*M. anisoplae* y *B. bassiana*). Con ello se espera obtener una recomendación apropiada para los ganaderos, desde el punto de vista de control de estos organismos dañinos y protección del ambiente, organismos benéficos y el humano al reducir el uso de agroquímicos.

II. OBJETIVOS

2.1 General

- Evaluar la efectividad a nivel de laboratorio y campo de dos aislados de *Beauveria bassiana* y uno de *Metarhizium anisopliae*, para el control de garrapatas (*Boophilus microplus*), en el ganado de la Universidad Nacional de Agricultura.

2.2 Específicos

- Determinar en laboratorio el parasitismo que causan dos aislados de *Beauveria bassiana* y uno de *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus* (estadio de larva).
- Determinar bajo condiciones de laboratorio la mortalidad de garrapatas causadas por conidias de *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.
- Observar la mortalidad en campo de las garrapatas post aplicación y el efecto que tiene en la reinfesta.
- Determinar la efectividad de los hongo *B. bassiana* (H4) y *B. bassiana* (*Rhyssomatus*) aplicado bajo condiciones de campo en dos frecuencias de aplicación

III. REVISION DE LITERATURA

3.1 Las garrapatas (*Boophilus microplus*)

Las garrapatas son ácaros macroscópicos caracterizados por poseer cuatro pares de patas y un cuerpo globoso, aplanado dorso-ventralmente y no segmentado, que las diferencia de otros arácnidos, cuyo cuerpo está dividido en dos partes, el cefalotórax y el abdomen (Márquez 2003).

3.1.1 Generalidades

La garrapata *Boophilus microplus* se distribuye geográficamente entre los paralelos 32 de los hemisferios norte y sur, originarios de la india, se introduce en américa por los conquistadores en el transcurso del siglo XVI al XVII. Considerándose uno de los principales ectoparásitos de los bovinos en algunos países tropicales y subtropicales, los vacunos y sus parásitos se expande rápidamente por toda américa (Cetra 2010, citado por Hernández 2010).

Son ectoparásitos obligados que se alimentan de la sangre de sus hospedadores (hematófagos). Durante la toma de sangre, y a través de varias vías como la saliva, el fluido coxal, la regurgitación del contenido intestinal o las heces, las garrapatas pueden transmitir a sus hospeda-dores un amplio y variado conjunto de patógenos causantes de graves enfermedades, algunas de ellas son letales (Aguilar 2010).

Las enfermedades que transmiten son uno de los grandes problemas de salud pública y veterinaria en el mundo; la severidad depende de la región, especies involucradas, agente transmisor, población de hospederos, situación socioeconómica y avance tecnológico en las medidas de control y tiene un efecto directo e indirecto (Alonso *et al.* 2006).

De acuerdo con sus características morfológicas y fisiológicas, las garrapatas se agrupan en dos grandes familias, garrapatas duras (Ixódidos) y blandas (Argásidos), de las cuales, las duras son las principales transmisoras de enfermedades, tanto a los animales como a las personas. Dichas enfermedades son actualmente más frecuentes que en pasadas décadas; este aumento en la frecuencia se debe, en parte, al cambio climático, el cual ha favorecido la difusión de especies de garrapatas propias de climas templados y tropicales hacia regiones climáticas muy diferentes de las de origen (Manzano *et al.* 2012).

Junto al cambio climático, el explosivo aumento de las poblaciones de determinados animales salvajes ha contribuido no sólo a una mayor dispersión geográfica de las especies de garrapatas, sino también a un aumento significativo de sus poblaciones, facilitando la aparición de los denominados “paisajes patógenos”. Estos paisajes se generan como consecuencia de nuevas interacciones entre la tierra, las personas, los vectores y sus hospedadores, todo lo cual determina una faceta específica para la epidemiología de las enfermedades transmitidas por garrapatas (Manzano *et al.* 2012)

3.1.2 Taxonomía

Las garrapatas pertenecen la clase Arácnida, orden Acarina, familia Ixodidae y presentan un ciclo de vida de 4 fases: Huevo, larva, ninfa y adulto. 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 1999, citado por Fernández 2006).

3.1.3 Anatomía

Las garrapatas *Boophilus microplus* tienen una cubierta dura, su anatomía está dividida en dos partes: el capítulo que está formado por el prosoma, el cuello y piezas bucales y el idiosoma que es el cuerpo, está formado por el tórax y el abdomen fusionados, otorgándole la forma globulosa que poseen. En los estadios de ninfa y adulto poseen cuatro pares de patas, mientras que en las larvas solo poseen tres pares de patas (Drugueri 2002).

Las piezas bucales que están ubicadas en el capítulo están formados por:

- a) El hipostoma: es una estructura que cumple la función de fijación y está formada por dos piezas unidas entre sí. En la parte ventral tiene dientes en hileras que varían en cantidad dependiendo del estado evolutivo.
- b) Los palpos cuya función es netamente sensorial o táctil, son articulados y se encuentran a los costados del hipostoma. La forma del prosoma y características de los palpos se utilizan para diferenciar géneros y especies.
- c) Los quelíceros, que se encuentran en la parte dorsal del hipostoma, sirven para cortar y perforar la piel.

En la parte ventral del cuerpo se encuentra el estigma respiratorio que se abre por detrás de las coxas, en el primer par de patas hay un aparato sensitivo (órgano de haller), en las hembras existe un aparato especial para producir una sustancia protectora de los huevos (órgano de gene). Las patas son articuladas y formadas por: coxa, trocánter, fémur, tibia, pretarso y tarso. Este último segmento a su vez se encuentra formado por: uñas (dos por pata) y pulvillo (órgano de adherencia). El aparato genital masculino está formado por testículo, vesículas seminales y vasos deferentes; el femenino por: un solo ovario, oviducto y orificio genital (Drugueri 2002).

3.1.4 Ciclo biológico

Las garrapatas tienen cuatro estados evolutivos en su ciclo vital, que son: el huevo, la larva o pinolillo, la ninfa y el adulto. El desarrollo de las garrapatas ocurre en 1, 2 o 3 hospederos por lo que se denominan garrapatas de 1, 2 o 3 hospederos. Las garrapatas del género *Boophilus* son de un solo hospedero. Mientras que la garrapata del género *Amblyomma* son de tres hospederos. Para

que las garrapatas logren su desarrollo, es necesario que se crucen por tres fases: no parasítica, de encuentro y parasítica (Manzano *et al.* 2012).

3.1.5 Fase por las que pasa *Boophilus spp.*

Las garrapatas pasan por tres fases durante su ciclo de vida, estas son descritas a continuación:

a) Fase parasítica

Es llamada de vida libre y comprende desde que la garrapata hembra repleta se desprende de su hospedero, hasta la aparición de las larvas en la vegetación. Esta fase se divide en cinco períodos: a) preoviposición, b) oviposición, c) postoviposición, d) incubación y e) eclosión (Márquez 2003).

a1) Preoviposición.

Comprende desde el desprendimiento de la garrapata repleta del hospedero hasta la postura del primer huevo. La garrapata *B. microplus* experimenta repleción final (un llenado de sangre), lo cual principalmente sucede durante la noche y se desprende al comienzo de la mañana. Al caer la garrapata al suelo busca lugares sombreados y protegido, para poder iniciar el proceso de oviposición (Márquez 2003).

a2) Oviposición.

Es el tiempo considerado desde que se inicia la puesta de los primeros huevos hasta los últimos. Este período puede ser seriamente alterado por factores ambientales, como son la radiación solar directa, la que puede destruir a los huevos.

a3) Post-oviposición

Es el periodo desde que la garrapata repleta pone el último huevo hasta su muerte.

a4) Incubación.

Este período comprende desde que se inicia la oviposición hasta la emergencia de las larvas, pudiéndose ver afectado por factores ambientales como son la humedad y temperatura, influyendo decisivamente en la evolución del embrión.

a5) Eclosión.

Durante esta período la larva emerge del huevo, los mejores porcentajes de eclosión se obtienen en temporadas que tienen una temperatura óptima de 25-35°C y una humedad relativa del 95%. Bajo condiciones controladas en el laboratorio, el porcentaje de eclosión es superior al 80% (Gutiérrez 2006).

b) Fase de encuentro

La fase de encuentro se define como el proceso de transferencia de las larvas desde la vegetación al hospedero y está influenciada por variables básicas como la distribución, longevidad, ritmos de actividad de las larvas, la estructura y tipo de vegetación, así como la densidad de bovinos y aspectos relacionados con su comportamiento en el pastizal. El encuentro de hospedero comprende dos períodos: pasivo y búsqueda (Villar 2006, citado por Hernández 2010).

b1) Período pasivo

Este período corresponde al primer estímulo posterior a la eclosión de las larvas requiriéndose de un período para que dichas larvas adquieran viabilidad necesaria para resistir los efectos del ambiente.

b2) Período de búsqueda

Es el tiempo que transcurre durante el período pasivo y el encuentro del hospedero, en este período las larvas utilizan su capacidad de sobrevivencia para resistir los efectos del medio ambiente, este evento está influenciado por diversos factores, considerándose de mayor importancia las condiciones ambientales, y sus reservas nutritivas las cuales afectan directamente a la longevidad, densidad y actividad de las larvas en los pastos y al mismo tiempo influyen en forma directa en la cantidad y calidad de los mismos (Gutiérrez 2006).

Este período es uno de los más críticos en la vida de las garrapatas, ya que necesitan encontrar un hospedero adecuado, nutrirse y completar su ciclo; además cuentan únicamente con sus reservas para resistir períodos prolongados de inanición. Otro aspecto que influye es la densidad de hospederos, es lógico que cuanto mayor sea el número de animales por unidad de superficie, más fácil resulta que la larva encuentre alguno (Márquez 2003).

Por otra parte es importante mencionar aspectos de comportamiento y fisiológicos de las larvas que les permite detectar movimientos de cuerpos en la cercanía cuando se encuentran en las partes superiores de los pastos agrupadas en grandes cantidades, los cuales hacen que estas incrementen su actividad cuando son estimulados por el desprendimiento de bióxido de carbono (CO₂) de la piel de los animales adoptando una posición particular al sostenerse en sus dos patas posteriores, extendiendo el par anterior, para tratar de adherirse al posible hospedero. La duración de la fase de encuentro varía de acuerdo a las condiciones climáticas, influyendo principalmente la temperatura y la humedad ambiental (Rodríguez *et al.* 2006).

La temperatura tiene una relación inversa con la duración de la sobrevivencia larval, es decir a medida que la temperatura aumenta, la duración de dicha fase disminuye. En cuanto a la humedad se refiere, en estudios realizados sobre el tema se ha observado que en los meses húmedos se presenta una mayor longevidad que en los meses secos (Rodríguez *et al.* 2006).

c) Fase parasítica

Es el período que completa el ciclo biológico la garrapata, desarrollándose una serie de eventos patológicos sobre el hospedero que conllevan a las pérdidas directas e indirectas ocasionadas por la presencia de estados de ninfas y adultos. Para poder implantarse requiere superar algunas barreras del hospedero como el tipo de pelo, ya que la espesura, la capilarización, densidad de glándulas sudoríparas y sebáceas, le ofrecen resistencia; asimismo, la posibilidad de ser alcanzadas durante el proceso de acicalamiento (Rodríguez *et al.* 2006).

Además, el aspecto competitivo con otras especies de garrapatas, restringen la incorporación de nuevos individuos. Los aspectos climáticos afectan poco el desenvolvimiento de la garrapata adulta, ya que el microclima donde se desarrolla está íntimamente relacionado a la fisiología del hospedero, factores como el calor irradiado del pelo, humedad y cobertura ofrecida por éste, lo protegen de las condiciones medioambientales. Por ello, el índice de mortalidad de las garrapatas durante esta fase está determinado por la resistencia del hospedero (Rodríguez *et al.* 2006).

3.1.6 Daños que ocasiona

Es el principal trasmisor de agentes que pueden conducir a enfermedades agudas, crónicas e incluso provocar la muerte, lesiones por la acción de sus piezas bucales en la piel, reducción del apetito, reducción de la inmunidad, debilitamiento y anemias al consumir grandes cantidades de sangre, deterioro de las pieles a causa de las perforaciones producidas por los piquetes, todo esto al final aumenta los costos al momento de querer solucionar cualquiera de los casos mencionados y esto es considerado como un daño económico (SENASA 2006).

Independientemente de que los animales atacados por garrapatas sean infectados con los patógenos que transmiten, estos siempre pueden morir de una severa anemia debido a que cada una de las garrapatas existente en la piel de su cuerpo succionan de 0.5 a 2.0 ml de sangre (SENASA 2006).

3.2 Hongos entomopatogenos

El termino entomopatógeno se ha definido por varios autores de distinta manera, y lo definen como aquellos microorganismo capaces de atacar insectos y mantener las plagas a un nivel que no ocasionen daños (García *et al.* s.f.).

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. Todos los insectos son susceptibles de ser afectados por algún hongo (Cañedo y Ames 2004).

Estos hongos se encuentran en la naturaleza, en rastrojos de cultivos, estiércol, en el suelo, las plantas, etc. Logran un buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol.

Los hongos entomopatogenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plagas. Prácticamente, todos los insectos son susceptibles a algunas de las enfermedades causadas por estos hongos. Se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatogenos. Entre los generos más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (CATIE 2001).

3.2.1 Descripción de *Beauveria bassiana*

Este hongo pertenece a la clase Deuteromycetes, orden Moniliales, Familia Moniliaceae). Se ha encontrado atacando a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas

de gran importancia agrícola, entre las plagas más importantes controladas por este hongo están la broca del café, la palomilla del repollo y el picudo del plátano (*Cosmopolites sordidus*). Los insectos muertos por este hongo presentan una cubierta blanca algodonosa sobre el cuerpo, la cual está formada por el micelio y esporas del hongo por lo que se le conoce con el nombre de hongo muscardino (Téllez *et al.* 2009).

3.2.2 Descripción de *Metarhizium anisopliae*.

Al igual que *B. bassiana*, este hongo pertenece a la clase Deuteromycetes, orden Moniliales, Familia Moniliaceae. Este patógeno ataca naturalmente a más de 300 especies de insectos de diversos órdenes. Algunas plagas que son afectadas por este hongo son la salivita de la caña de azúcar (*Aeneolamia varia*), y chinches plagas de diversos cultivos. Los insectos muertos por este hongo son cubiertos completamente por micelio, el cual inicialmente es de color blanco pero se torna verde cuando el hongo esporula (CATIE 2001).

3.2.3 Modo de acción

El desarrollo de la enfermedad en el insecto está dividido en tres fases: (1) adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto, (2) penetración en el hemocoele y (3) desarrollo del hongo, que generalmente resulta en la muerte del insecto (Téllez *et al.* 2009).

3.2.4 Adhesión de la espora a la cutícula del hospedero y germinación

El primer contacto entre el hongo entomopatógeno y el insecto sucede cuando la espora del primero es depositada en la superficie de este último. El proceso de adhesión ocurre en tres etapas sucesivas: adsorción de la espora a la superficie mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteica en el insecto, la adhesión o consolidación de la interface entre la espora pre germinada y la epicutícula y finalmente, la germinación y desarrollo hasta la formación del apresorio para comenzar la fase de penetración (López 2007).

El proceso de adhesión de la espora a la cutícula del insecto, está mediado por la presencia de moléculas sintetizadas por el hongo denominadas adhesinas. En el entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* se ha descrito un tipo de adhesina denominada MAP1 la cual se localiza en la superficie de los conidios (Pucheta *et al.* 2006). La expresión heteróloga de MAP1 en *Saccharomyces cerevisiae* le confiere a la levadura propiedades adherentes específicamente a la cutícula de los insectos. La disrupción del gen que codifica para MAP1 afecta la germinación y la formación de blastosporas (López 2007).

3.2.5 Penetración en el hemocele

La forma en la que los hongos entomopatógenos penetran en el insecto depende de las propiedades de la cutícula tales como: el grosor, la esclerotización y la presencia de sustancias anti fúngicas y nutricionales. Una vez establecido el proceso de adhesión, continua la penetración la cual es posible gracias a la acción combinada de dos mecanismos uno físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por una estructura fúngica denominada haustorio, la cual deforma primeramente la capa cuticular rompiendo luego las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula (Pucheta *et al.* 2006).

El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de actividades hidrolíticas tales como proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido en la zona de penetración, facilitando la entrada del hongo. De la misma forma la sobre expresión del gen que codifica para la quitinasa de *Beauveria bassiana* acelera el proceso de muerte en los insectos en un 23%. De esta manera, se demuestra la importancia de la secreción de estas enzimas hidrolíticas en la virulencia de los hongos entomopatógenos, lo cual pudiera ser una herramienta para la selección de mejores cepas para la formulación de insecticidas biológicos (Cañedo y Ames 2004).

Otro mecanismo que utilizan los hongos para penetrar al hemocele es a través de la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas del insecto. Puesto que la humedad no es un problema en el tracto alimenticio, la espora puede germinar rápidamente en este ambiente; aunque los fluidos digestivos pudieran destruirla o degradar la hifa germinativa. En algunos casos, la digestión de

estructuras fúngicas puede causar la muerte por toxicidad más que por la micosis (Cañedo y Ames 2004).

3.2.6 Replicación en el hemocele

Después de llegar al hemocele, la mayoría de los hongos realizan transición dimórfica de micelio a levadura y una vez que han evadido el sistema inmune del insecto, se produce una septicemia.

La micosis induce a síntomas fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación, comportamientos alterados y parálisis. La muerte sobreviene por una combinación de efectos que comprenden el daño físico de tejidos, toxicases, deshidratación de las células por pérdida de fluido y consumo de nutrientes (Cañedo y Ames 2004).

Ya en el interior del insecto, los hongos deben enfrentarse con los mecanismos de respuesta del sistema inmune para lo cual han desarrollado estrategias defensivas e inmunosupresoras, como la producción de toxinas o cambios estructurales en su pared celular. Un tema muy común en la literatura de patología de insectos es la producción de toxinas por diversas especies de hongos entomopatógenos. Existe un considerable número de metabolitos secundarios de bajo peso molecular que han sido aislados de patógenos de insectos, muchos de los cuales han demostrado poseer actividad insecticida marginal (Díaz 2012).

3.3 Resultados de investigación sobre la eficiencia de los hongos entomopatógenos en el control de plagas.

Fernández *et al.* (2005) evaluó la infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de una cepa de *Boophilus microplus* sensibles y otra resistente a los organofosforados, por medio de un ensayo in vitro con hembras ingurgitadas recién desprendidas del bovino, utilizando la cepa ECS1 de *M. anisopliae*. El micromiceto *M. anisopliae* demostró ser altamente infectivo, tanto para la cepa sensible como para la resistente a los organofosforados, a la concentración de 10^8 esporas/ml, resultando en 100 % de mortalidad para ambas cepas, a los 20 días posteriores a la inoculación.

La mortalidad de las garrapatas varió considerablemente de acuerdo a la concentración de las esporas, con valores CL50 de 10^3 esporas/ml para la cepa sensible, y 10^2 esporas/ml para la resistente. *Metarhizium anisopliae* mostró que puede ser considerado como un acaricida potencial para el control biológico de garrapatas *B. microplus* resistentes y susceptibles a los organofosforados.

Fernández (2006) observó en laboratorio una alta capacidad de *B. bassiana* para infectar larvas de *B. microplus* a una (CL50) de 434 ppm (8.45×10^7 conidias/ml). Logrando llevar y mantener las poblaciones de garrapatas en animales hasta un nivel inferior al nivel crítico en un periodo de 5 semanas en todas las frecuencias de aplicación probadas.

Lopez *et al.* (2009) evaluaron el efecto de ocho cepas de *Metarhizium anisopliae* sobre la garrapata *Boophilus microplus* en condiciones de laboratorio y campo, encontrando que la cepa de *Metarhizium anisopliae* (137bm) disminuyó la capacidad reproductiva (oviposición) de la garrapata, del 90 al 96%, cuando las garrapatas adultas fueron tratadas in vitro con 1×10^8 y 1×10^9 conidias/ml. También redujo la viabilidad de los huevos de este artrópodo en más del 98% en las mismas dosis.

En los ensayos a nivel de campo lograron reducir la infestación de garrapatas en un 75% en vacas Holstein x Cebú, cuando aplicaron *M. anisopliae* 137bm a una concentración de 1×10^8 conidias/ml, aplicando 1 litro de la suspensión por cada 100 kg de peso animal. Además, observaron que la fecundidad de las garrapatas provenientes de vacas tratadas con *M. anisopliae* fue tres veces inferior que las del grupo control. Por otra parte, la cepa 137bm aplicada en la pradera a una concentración de 5×10^{12} conidias/ha, causó una disminución en la población de larvas en cerca del 86% una semana después de una aspersión con conidias de *M. anisopliae*.

Bazan (2002) evaluó el efecto del hongo *Metarhizium anisopliae*, sobre el número y peso de garrapatas, período de preoviposición e incubación del huevo de *Boophilus microplus* en ganado bovino, bajo condiciones de establo, a la concentración de 1×10^8 conidias/ml. Se encontró que los tratamientos formados por el hongo y el acaricida, disminuyen el número de garrapatas, pero

el hongo no presentó diferencias significativas con el testigo; el peso de la garrapata, el período de preoviposición e incubación del huevo no fue afectada por el hongo.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación consto de dos fases: una evaluación se llevó a cabo a nivel de laboratorio y la segunda a nivel de campo.

4.1 Ubicación de la investigación a nivel de laboratorio

El estudio se realizó en el laboratorio de entomopatógenos de la Universidad Nacional de Agricultura, localizado a seis kilómetros de distancia de la ciudad de Catacamas, Olancho, a una altitud de 350 msnm y una precipitación promedio anual de 1,350 mm y una temperatura promedio anual de 28°C.

4.2 Materiales y equipo.

Los materiales utilizados fueron:

P.D.A. (Papa dextrosa agar), bisturís, papel manila, mechero de alcohol, papel parafina, alcohol de quemar, mascarilla con filtro, fósforos, atomizador, agua destilada, porta objetos, azul de metilo, cubre objetos, jeringas de cinco ml, contómetro (contador manual de esporas), placas petri de 100 x 15 mm, elenmeyer, beakers, tubos de ensayos, cámara de newbaver, probeta plástica de 2 litros, papel toalla, bolsas negras de polietileno, arroz, cubeta plástica, cinta métrica, ganado bovino, pinzas, arroz, bolsa plasticas.

El equipo utilizado fue:

Refrigeradora, bomba de mochila manual, Cámara de flujo Laminar (Biosafety class 2 labconco), Cámara digital Canon, autoclave (All america model 25x), cámara fotográfica USB (motic 350) Micro- pipeta 5µl a 50 µl (Transferpette), horno (Gallenkank), calentadores (Fisher Scientific.), estereoscopio (Meiji), refrigeradora, microscopio (Meiji)

4.3 Manejo del experimento

En este trabajo se utilizó la metodología desarrollada por Avila 2011, para la reproducción de hongos en laboratorio, siendo la siguiente:

4.3.1 Asepsia

El laboratorio de hongos entomopatógenos se sometió a procesos de limpieza general y desinfección desde materiales, equipo e infraestructura; utilizando como agente desinfectante el hipoclorito de sodio al 3.62% concentración comercial, y este se disolvió a una concentración del 2%, a través de un cálculo matemático (regla de tres).

4.3.2 Lavado

Se lavó todos los materiales con agua destilada y detergente para remover cualquier residuo de materia orgánica, y luego se enjuagó con abundante agua removiendo las partículas del detergente.

4.3.3 Esterilización

Se esterilizó bajo dos métodos: la esterilización húmeda a través de la utilización de autoclave y esterilización con aire caliente (horno), la utilización de cada método dependió de los materiales a esterilizar. La esterilización de los materiales y cristalería se hizo por calor húmedo con presión de vapor de agua, se llevó a cabo con la ayuda de un autoclave, el cual se manejó a una presión de

2 atmosferas o 15 libras psi, hasta alcanzar una temperatura de 121.6 C ° a 124 C°, la cual se mantuvo durante un tiempo de 15 minutos; también se esterilizó los medios de cultivo, platos petri, tubos de ensayo, papel toalla.

La esterilización con aire seco, se llevó a cabo con el horno y consintió en someter a los materiales a una corriente de aire caliente, a una temperatura de 121°C por un tiempo de 15 a 20 minutos, este método se utilizó para esterilizar platos petri, beakers, elenmeyer y pipetas.

4.3.4 Desinfección del ambiente (laboratorio y almacenamiento).

La desinfección a nivel de laboratorio se hizo de manera muy exigente para evitar contaminación de otros microorganismos que no eran parte del estudio. Toda área en la cual se llevó a cabo el trabajo de aislamiento fue desinfectado con hipoclorito de sodio al 2%, llevando a cabo esta labor no más de 10 minutos y evitando la aplicación en lugares donde se encontraba inoculado el hongo entomopatógeno; se desinfecto diariamente y se intensificaba cuando se realizaban aislados.

La cámara de aislamiento se desinfectó antes de cada aislamiento con alcohol al 70% por dentro y fuera de la misma, se encendió el mechero y se mantuvo la cámara cerrada por termino de un minuto, el mechero se mantuvo encendido en todo el proceso de siembra, luego se procedió a realizar los aislamientos y siembra de las cepas a evaluar; la desinfección personal se llevó a cabo siempre antes de realizar aislamientos y después de los mismos, y consistió con la aplicación por aspersión a las manos con alcohol al 70%.

Como último paso para la desinfección fue la utilización de la luz ultravioleta tipo C, con el objetivo de eliminar cualquier contaminante que haya ingresado, al momento de realizar el aislamiento.

4.3.5 Medio de cultivo PDA-SDA.

Papa dextrosa agar MERCK y SDA (saboraud dextrosa agar) BIOTEC, del que se pesó 40 g de medio de cultivo P.D.A y 62 g de SDA cada producto por separado fue diluido en 1000 ml de agua esterilizada, luego se sometieron las soluciones en un calentador-agitador hasta que se disolvieron completamente ; ya disueltas, se utilizó la técnica de siembra en tubos de ensayo, lo cual se vertió el medio en los tubos de ensayo y posteriormente fueron tapados con algodón envuelto con tela de punto y masking tape para crear un tapon artesanal, luego se colocaron en forma ordenada en un elenmeyer de 500 ml y tapado con papel tapiz.

Dicho medio se sometió al auto-clave hasta alcanzar 121°C a 14 psi de presión durante 15 minutos, cuando se terminó la esterilización se procedió a trasladarlos a la cámara de flujo laminar donde se les dio una inclinación de manera que el medio pudiera cubrir una mayor área del tubo de ensayo, hasta que pudiera solidificarse y quedara listo para la siembra.

4.4 Manejo del inóculo

4.4.2 Aislamiento y reproducción

Se realizó aislamiento del hongo a partir de insectos de la especie *Metamasius hemipterus* parasitados por *B. bassiana*, cepa encontrada en los predios de la Universidad Nacional de Agricultura precisamente en los campos de musáceas de la sección de cultivos industriales, se utilizó la técnica de aislamiento directo que a continuación se describe.

La cepa de *M. anisopliae* evaluada es procedente del instituto de control biológico (BATОВI) de Uruguay, utilizando aislamientos del cepario que tiene la universidad.

4.4.3 Aislamiento directo

a) La técnica de aislamiento directo consistió en la obtención directa del hongo a partir del cuerpo del insecto, pasándolo luego a un medio nutritivo P.D.A. Esta técnica es muy desventajosa debido a que puede haber contaminación porque el insecto posee otros microorganismos. Por esta razón se realizó una desinfección externa del insecto con hipoclorito de sodio al 2%, enjuagándose con agua destilada estéril.

Para ello se sumergió al insecto en la solución de hipoclorito de sodio por un tiempo de 20 segundos, luego se sumergió en agua destilada esterilizada con una duración de 20 segundos, se repitió una vez más este último paso para asegurar la eliminación de moléculas del hipoclorito de sodio y se depositó el insecto sobre papel toalla para secarlo y después se depositó el insecto en un medio de cultivo para obtener las esporas.

b) Reproducción a partir del aislamiento directo

Se escogieron los platos petrí que presentaban mayor porcentaje de pureza los que se escogieron, etiquetándose como fuente uno (F1), esta fue la fuente de inóculo. Las posteriores siembras, se etiquetaron como F2, a partir de estas se obtuvo la solución madre con la que se inocularon las bolsas de arroz para obtener una reproducción masiva utilizando el arroz como sustrato, inoculando 100 gramos de arroz con 30 ml de solución madre y de esta inoculando las larvas de *Boophilus microplus*; el período de incubación de la F2 fue durante los 20 días siguientes, en el espacio de la cámara de cría del laboratorio, donde prevaleció una temperatura entre 23 a 28°C.

4.5 Evaluación de rendimiento y viabilidad

La germinación de los hongos entomopatogenos se ve afectada por el porcentaje de viabilidad que estos tienen, por esto es importante determinar la viabilidad de cada cepa y su rendimiento.

4.5.1 Rendimiento de conidias / ml de solución

Se determinó, la concentración de conidias por ml de solución a los 21 días después de la siembra del F2, realizando el conteo utilizando la cámara de Neubauer modificadas.

A partir de los cultivos puros, se preparó diluciones en serie de (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) del entomopatogeno, hasta que obtuvo una dilución que permitió realizar el conteo. Las diluciones se prepararon de la siguiente manera:

Se extrajo un gramo de producto comercial y se aplicó a un tubo que contenía 9 ml de agua destilada estéril con INEX 27.9 SL al 0.001%, se agito fuertemente durante un minuto para homogenizar la solución. La transferencia se hizo utilizando una micro pipeta estéril, obteniendo la dilución adecuada (10^{-2}), para efectuar las lecturas de conidias a través de la cámara Neubauer, para ello de la dilución seleccionada, se tomó con una micro pipeta la cantidad de 5µl de solución de 10^{-2} y se depositó en la cámara de Neubauer.

El conteo de conidias se realizó a través del microscopio mediante un aumento de 40 X, se utilizándose el cuadro principal central, el cual está dividido en 25 cuadritos secundarios y con la ayuda de un contometro se realizó el conteo, luego se calculó la cantidad de conidias/ml existente en la solución de la siguiente manera:

El número de conidias que se observaron en los cuatro cuadrados de la esquinas y el del centro, sacándose un promedio de los mismos, este valor multiplicado por las dimensiones de los cuadros de la cámara Neubeaur para obtener el volumen de dilución en los que se encontraban los conidios, posteriormente por regla de tres se calculó el número de conidias por mililitro de solución.

4.5.2 Viabilidad

Las cámaras de incubación fueron esterilizadas junto con los platos petri, papel filtro y porta objetos, en el autoclave a 1.2 bares de presión y 121 C° por un tiempo de 20 minutos.

Se preparó el medio de cultivo (P.D.A) esterilizado en el auto clave, posteriormente con una pipeta pasteurs se depositó dos alícuotas de P.D.A. en un porta objeto a cada extremo del mismo, luego se procedió a depositar con una pipeta pasteur sobre las mismas alícuotas del medio, dos alícuotas de la suspensión del hongo y se colocó el montaje en una cámara húmeda, la cual consistió en un plato petri con papel toalla humedecida esterilizada, con la finalidad de favorecer la germinación del entomopatogeno.

Los porta objetos inoculados se incubaron en un sitio de crecimiento a temperatura entre 24 y 26C°, dejándolos durante 20 horas, tiempo suficiente para determinar los porcentajes de germinación, posteriormente se realizó el montaje en un microscopio a un aumento de 40X, para poder observar la cantidad de esporas geminadas y no germinadas y así determinar los porcentajes de germinación de ambas cepas. Se consideró como esporas germinadas aquellas que tenían el tubo germinativo con un tamaño doble o superior al tamaño de la espora.

4.6 Producción de garrapatas en laboratorio.

En el laboratorio se utilizaron larvas de garrapatas recién nacidas, para obtenerlas se hizo el procedimiento descrito por Cardona s.f. citado y Fernández (2006) ligeramente modificado, que consistió en:

Del ganado de la universidad (unidad de vacas secas) se recolecto garrapatas en estado adulto (Teóliginas) con un largo de 4 a 8 mm las que fueron identificadas taxonómicamente, seleccionando especímenes de *B. microplus*. Las garrapatas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.1 por ciento sumergiéndolas por un minuto y luego se colocaran sobre

una hoja de papel toalla para retirar el exceso de humedad, posteriormente se trasladaran a 5 placas petri a razón de 8 adultos por placa para su ovoposición.

Luego de la oviposición, los huevos se reconocieron por su forma, color y textura, los que fueron colocados en tubos de ensayos los que fueron tapados con algodón para permitir el intercambio gaseoso, se esperó 27 días para la eclosion de los huevos obteniendo larvas listas para el bioensayo.

4.7 Inoculación de los hongos entomopatógenos, sobre *Boophilus microplus*.

Se preparó una solución de conidias con cada cepa del hongo evaluado, con la que se inoculó las larvas de *Boophilus microplus*, la dosificación utilizada se presenta en el cuadro 1.

Cuadro 1 Descripción y dosificación de los tratamientos.

Tratamiento	Concentración de conidios/ml (dosificación)
T1 <i>B. bassiana</i> (H4)	1×10^8
T2 <i>B. bassiana</i> (<i>Rhyssomatus</i>)	1×10^8
T3 <i>Metarhizium anisopliae</i>	1×10^8
T4 Testigo (agua destilada)	0

La técnica de aplicación del inóculo fue la inmersión, para ello se sumergieron las larvas en la soluciones de *B. bassiana* (H4), *B. bassiana* (*Rhyssomatus*) y de *M. anisopliae* a la dosis de 10^8 conidias/ml, durante 10 segundos, se sumergió un total de 100 larvas de garrapatas por cada cepa del hongo (por tratamiento), dando un total de 400 larvas inoculados (300 con los hongos y 100 con el testigo), para el testigo se sumergió en agua destilada durante un tiempo de 10 segundos.

Después de la inoculación, cada larva fue colocada en tubos de ensayo con papel toalla y algodón para permitir el intercambio gaseoso, colocando en cada tubo un total de 10 larvas, estos fueron etiquetados, identificando cada tratamiento y repetición y posteriormente ubicados en estantes distribuidos al azar de la forma en que indica el DCA, temperatura ambiente que osciló entre 23 a 31° C durante el período de evaluación que fue de 10 días, siendo expuestos a 12 horas luz y 12

horas de oscuridad; se llevaron registros de mortalidad diarios haciendo conteos de las larvas vivas, muertas y observando el tiempo de esporulación del hongo en el cuerpo de las larvas.

Para observar el tiempo de colonización del hongo, se trasladó cada larva muerta a una cámara húmeda anotando la fecha en que se encontró muerta la larva, como también el tratamiento y repetición de procedencia, observando diariamente a través del estereoscopio el inicio del crecimiento micelial.

4.7 Variables evaluadas en laboratorio

4.7.1 Mortalidad provocada por las cepas

Se tomaron datos diarios de la mortalidad de las larvas por cada cepa. Se revisó diariamente todos los tubos de ensayo para contabilizar las larvas muertas y vivas después del proceso de inmersión, por regla de tres se obtuvo el porcentaje de mortalidad, relacionando el total de larvas que habían en el tubo y las larvas que se encontraban muertas en cada día, además se observó el tiempo de esporulación (presencia de micelio al exterior de las larvas), exponiendo las larvas muertas en cámaras húmedas durante 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.

Las larvas muertas se trasladaron a una cámara húmeda, con el fin de generar condiciones apropiadas para la esporulación del hongo, anotando el día de mortalidad, tratamiento y repetición con el objetivo de observar el tiempo que tarda la colonización del hongo, apuntando la fecha en que se encontró la presencia de esporulación y el crecimiento micelial diario, fue observado a través de un estereoscopio.

4.7.2 Determinación del tiempo letal medio (TL50)

Esta variable de laboratorio se determinó, llevando registro diarios de mortalidad, iniciando a las 48 horas después de haber asperjado las larvas por los hongos, se revisaron todas las placas correspondientes a cada tratamiento y todas sus repeticiones en las que se inocularon los hongos,

dicho proceso se realizó para medir el tiempo que tardó el aislado para matar el 50% de las larvas inoculadas. Por cada aislado y testigo se utilizaron 100 larvas, con 10 larvas por repetición, se llevó registro de mortalidad durante doce días.

4.7.3 Tiempo de colonización y número de garrapatas parasitados

Esta variable se determinó contabilizando el tiempo que tardó las larvas en desarrollar el micelio característico para cada cepa, partiendo del día en que murió para ello se observó diariamente las larvas, contabilizando la presencia de micelio, para *Beauveria bassiana* una esporulación blanca y *M. anisoplae* esporulación de color verde; se descontinuaron las lecturas cuando se presentó los primeros micelios colonizando a las larvas.

4.8 Evaluación a nivel de campo

En esta etapa se evaluó los aislados de *B. bassiana* (H4) y *B. bassiana* (*Rhyssomatus*), así como el un producto químico Bovitraz (Amitraz al 12.5%) como testigo relativo, en diferentes frecuencias de aplicación indicadas en el cuadro 2.

4.8.1 Ubicación del experimento

La investigación se realizó en el departamento académico de producción animal de la Universidad Nacional de Agricultura, sección de bovinos, localizada a seis kilómetros de distancia de la ciudad de Catacamas, Olancho, a una altitud de 350 msnm y una precipitación promedio anual de 1350 mm y una temperatura promedio anual de 28°C.

4.8.2 Diseño experimental y tratamientos evaluados

Se usó el diseño completamente al azar (DCA) con cinco tratamientos y tres repeticiones, cada repetición consistió de una vaca adulta de la raza holstein, pardo y jersey; los tratamientos pueden ser observados en el cuadro 2.

Cuadro 2 Descripción, dosificación y frecuencia de aplicación de los tratamientos a nivel de campo

N^o	Tratamientos	Frecuencia de aplicación	Tiempo de Aplicación	N de aplicaciones	Concentración de aplicación
1	<i>Beauveria bassiana</i> (H4) (Mejor cepa evaluada en lab.)	Cada 7 días	6 semanas	6	1x10 ⁸ conidias/ml
2	<i>Beauveria bassiana</i> (H4) (Mejor cepa evaluada en lab.)	Cada 14 días	6 semanas	3	1x10 ⁸ conidias/ml
3	<i>B.bassiana</i> (<i>Rhyssomatus</i>)	Cada 7 días	6 semanas	6	1x10 ⁸ conidias/ml
4	<i>B.bassiana</i> (<i>Rhyssomatus</i>)	Cada 14 días	6 semanas	3	1x10 ⁸ conidias/ml
5	Bovitraz (Amitraz al 12.5%)	Cada 21 días	6 semanas	2	Amitraz 12.5%

4.8.4 Aplicación de los tratamientos

En total se realizaron seis repeticiones para los tratamientos con frecuencias de siete días, tres aplicaciones para los tratamientos con frecuencias de catorce días y dos aplicaciones para el químico cuya frecuencia fue de 21 días. La primera aplicación de todos los tratamientos se realizó el 07/08/2013 a partir de la cual, se contabilizó las frecuencias correspondientes.

Se utilizaron tres repeticiones y cada una consistió de un bovino adulto de la unidad de ganado lechero, a las que se infectó en la parte del escudo de la ubre con veinte o más garrapatas en estado adulto (teleoginas) por animal.

Las vacas fueron marcadas (con orejeras) para diferenciar los tratamientos y repeticiones a los que se le colocó el número de tratamiento y repeticiones (T1R1, T2R2, etc).

Todos los tratamientos fueron aplicados mediante un baño de aspersión utilizando una bomba de mochila manual de 20 lts. Se determinó la cantidad exacta a aplicar/animal asperjando previamente y haciendo una calibración del equipo, calculando la cantidad de caldo plaguicida/animal, sin que ocurriera pérdida del producto por escurrimiento, para ello previamente se bañaron con agua 10

animales y de allí se calculó cual fue el gasto promedio de agua por animal, así mismo se pesaron los animales en una pesa digital para determinar el peso de cada uno, posteriormente se aplicaron los tratamientos diluyendo el producto comercial (hongos entomopatogenos y el producto químico por separado) con agua y depositándolo en la bomba de mochila estas soluciones fueron homogenizadas previo a cada aspersión.

El hongo se aplicó a una concentración de 1×10^8 conidias/ml, aplicando 1 litro de la suspensión por cada 100 kg de peso animal, posteriormente se realizaron los cálculos matemáticos en base al peso de cada unidad experimental. Para el caso del tratamiento químico se aplicó diluyendo un ml de producto químico por un litro de agua en la bomba de mochila.

En total para cada tratamiento evaluado en campo, se realizaron tres lecturas o muestreos en forma semanal.

4.8.5 Variables evaluadas

Sobrevivencia

A través de conteos visuales y táctiles, se realizaron los muestreos en pre-aplicación y post-aplicación en todos los animales seleccionados en donde se determinó la sobrevivencia. Se usó un marco construido de cartón con dimensiones de 20×20 cm para muestrear el escudo de la vaca que está ubicado en la parte superior de la ubre y se marcó para evitar variabilidad en la ubicación. Éste lugar se seleccionó debido a la alta susceptibilidad de infesta. Contando en esta área la cantidad de garrapatas vivas y muertas, anotando los datos en el formato de registro del anexo 2. Realizando para cada muestreo un ANAVA para ver si hay diferencias estadísticas entre tratamientos y se utilizó la prueba de media de DUNCAN a un nivel de significancia del 5%.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Mortalidad causada en laboratorio por las cepas evaluadas.

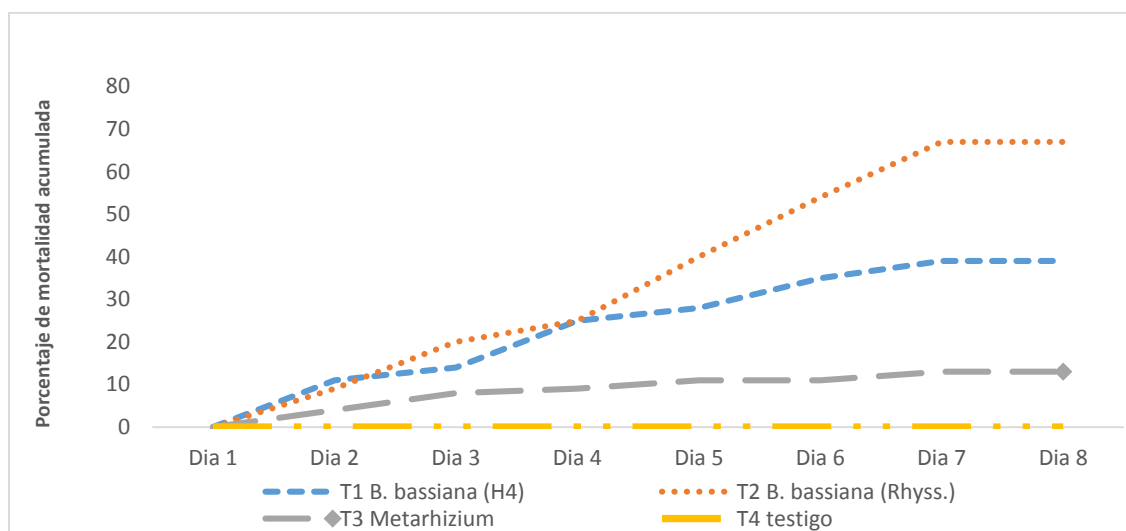


Figura 1 Mortalidad diaria acumulada de larvas de *Boophilus microplus*, causada por los hongos entomopatogenos.

La última lectura que se realizó a los doce días, pero del día ocho al día doce no hubo mortalidad en ningún tratamiento; el tratamiento con *B. bassiana Rhyssomatus* (T2) fue el que presentó el mayor porcentaje de larvas muertas, con 68% de mortalidad acumulada Figura 1. El tratamiento con *B. bassiana (H4)*, (T1), presentó el segundo porcentaje de mortalidad más alto con un 39%; seguido por *Metarhizium anisopliae* (T3) con un 13%, podemos observar que en todos hubo efecto bioplaguicida pero en unos con menor virulencia. En el testigo (sin aspersión) la mortalidad fue cero durante los doce días que se evaluó figura 1.

Para determinar si para mortalidad de larvas, existía significancia estadística entre los tratamientos, se realizó un ANAVA con el programa estadístico Infostat con una prueba de media de DUNCAN con un grado de significancia del 5% ($P \leq 0.05$); los resultados son los siguientes:

El ANAVA indica que si hay significancia estadística ($P \leq 0.001$) entre tratamientos, y la media de DUNCAN determina que *Beauveria bassiana* (*Rhyssomatus*) (T2), es el que causo el mejor control, en comparación a *Metarhizium*, *Beauveria bassiana* (H4) y el testigo.

Al encontrar 0% de mortalidad en el testigo (T4) aseguro, que la muerte de las larvas es debida únicamente a la acción de los hongos entomopatógenos.

Pucheta (2006), menciona que estos hongos inician su proceso infectivo cuando las esporas son retenidas en la superficie del integumento, donde se inicia la formación del tubo germinativo, comenzando el hongo a excretar enzimas como las proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas y lipooxigenasas, y esto ocasiona la muerte del insecto después de 3 a 14 días de iniciada la infección. Una vez muerto el insecto y agotados muchos de los nutrientes, el hongo inicia un crecimiento micelial e invade todos los órganos del hospedero. Esto nos dice que hay una relación entre el tiempo en que se manifestaron los tratamientos en la presente investigación.

Mejia *et al.* 2008 encontró que la cepa de *Beauveria brongniartii* fue el mejor biocontrolador del insecto *Bactericera cockerelli* (*Paratrioza*), presentando la mortalidad y agresividad más alta, seguido por *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*.

5.2 Determinación de TL 50

El tiempo letal medio (TL 50) o sea el tiempo que transcurre desde que se impregnaron las larvas hasta que murió el 50% de ellas, debido a que solo se hicieron observaciones hasta los doce días, únicamente la cepa *B. bassiana* (*Rhyssomatus*) fue la que presentó dicha mortalidad a los seis (6) días, indicándonos que para los demás tratamientos el TL50 está más allá de los doce días a la dosis evaluada (Figura 2).

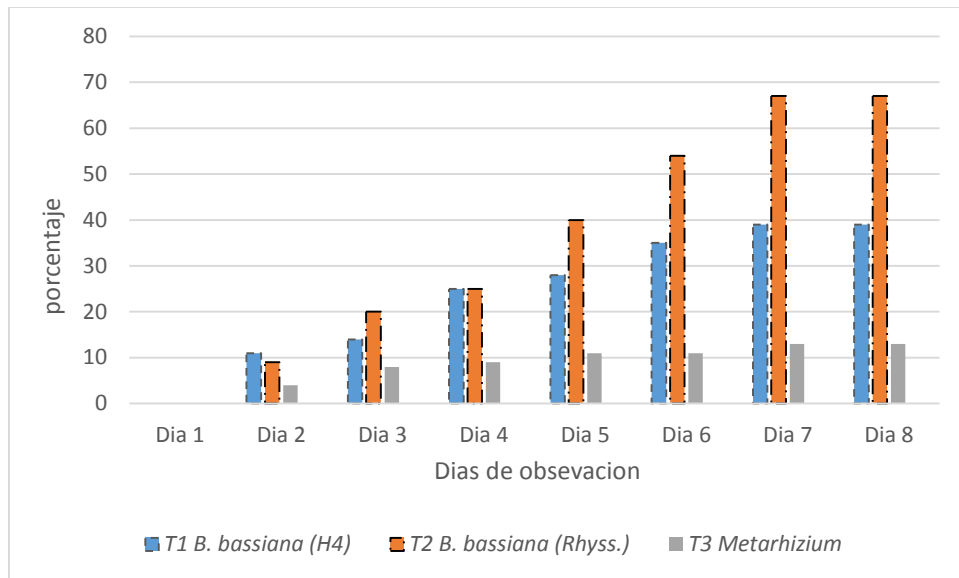


Figura 2. Mortalidad diaria acumulada de larvas de *Boophilus microplus*, causadas en laboratorio por los hongos entomopatogenos.

La cepa de *B. bassiana* (extraída del insecto *Rhyssomatus sp*) se comportó con mayor agresividad en comparación a las demás porque fue la que alcanzo el menor tiempo (seis días) mientras que *M. anisopliae* únicamente mato un 13% en el período de evaluación y *Beauveria bassiana* (H4) alcanzo un 39%; el testigo no presento mortalidad durante su tiempo evaluado (doce días)

Avila (2011) encontró resultados similares a los obtenidos en la presente investigación con cepas de *Beauveria bassiana* y *Metharhizium anisoplae* a una dosis de 1×10^8 conidias/ml logrando similares porcentajes de mortalidad, alcanzando la TL50 a los cinco días a diferencia que en esta investigación se encontró a los seis días post inoculación.

Acosta (2006) observó que la cepa de *Metharizium anisopliae* en concentraciones más altas a las aquí estudiadas (1×10^{11} conidias/ml) encontró un porcentaje de mortalidad de larvas del 35% y con concentraciones de 10^9 hubo una mortalidad del 30% en *Scutigereella immaculata* (artrópodo que ataca las flores).

Gonzales (2001) nos dice que normalmente, los hongos entomopatógenos son de acción lenta. Pero estos productos dependen generalmente de las condiciones ambientales especialmente

temperatura y requieren de una elevada humedad relativa para que su desarrollo y acción patógena sea la adecuada. Generalmente tardan una semana como mínimo en eliminar a la víctima o al menos en que esta deje de alimentarse, estos nos dice que hay una gran similitud con la investigación realizada sobre *Boophilus microplus*.

5.3 Tiempo de colonización y número de larvas parasitadas.

Las cepas *Beauveria bassiana* (*Rhyssomatus*) y *Beauveria bassiana* (H4) presentaron crecimiento micelial sobre las larvas de *Boophilus microplus* similar desarrollandose hasta los cuatro días un buen crecimiento de micelio, mientras que *Metarhizium anisopliae* presentó micelio tempranamente a los de 3 días después de la muerte de la larva.

En el caso de *Beauveria bassiana* (*Rhyssomatus*) de un total de 68 larvas muertas, todas presentaron crecimiento micelial y en el caso de *M anisopliae* de un total de 13 larvas muertas también todas presentaron crecimiento micelial; por lo tanto podemos confirmar que todas las muertes que se dieron en los tratamientos fueron a causa de los hongos entomopatogenos y no por daños mecánicos, porque también en el testigo hubo cero mortalidad.

Después de la muerte del insecto a causa de las micotoxinas, el hongo entra en una etapa facultativa dentro de la cual empieza el proceso de crecimiento del micelio; este proceso tarda entre 24 a 48 horas, según las condiciones que presente el medio, dentro de la cual favorezca el crecimiento del mismo (FUNICA 2003).

Diaz 2012 encontró que la cepa de *Beauveria bassiana* mostró mayor esporulación diferenciándose desde el día cuatro hasta el día 7, para el caso de *Metharizium* y *B. bassiana* (*Rhyssomatus*) su esporulación fue similar durante todo el período de observación, para los días uno hasta cuatro y según la prueba de media realizada no tuvieron diferencias significativas entre ambos.

5.4 Variable evaluada en campo.

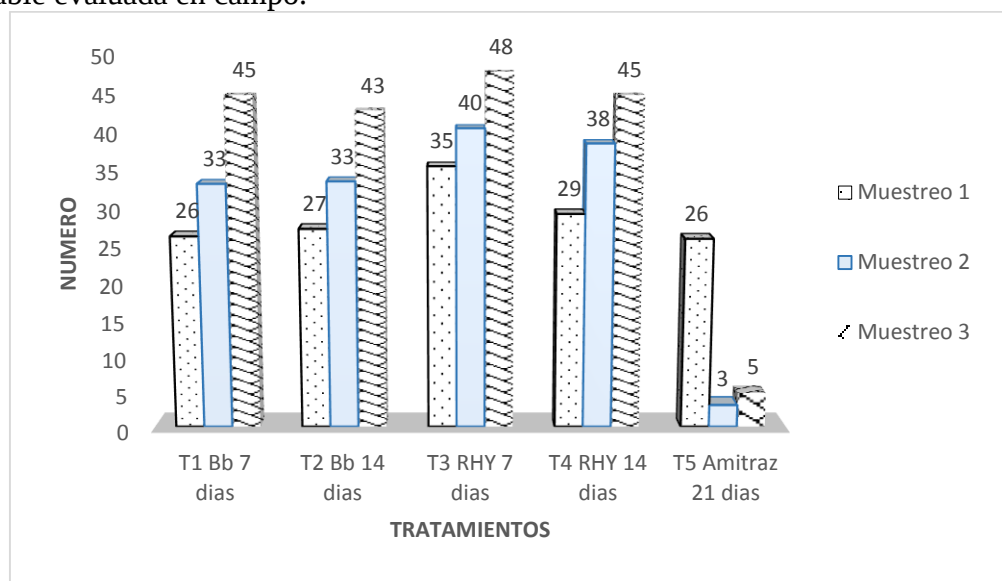


Figura 3. Supervivencia acumulada de *Boophilus microplus* en estado adulto (Teologina) presentada por los tratamientos.

Resultados evaluados por la siguiente variable muestran que existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($P < 0.05$) en donde la prueba de media (Duncan) nos muestran que el tratamiento químico mostro diferencias, siendo el mejor tratamiento, en cuanto a los tratamiento biológicos nos mostraron diferencias significativas entre ellos, no tuvieron ningún efecto bioplágica.

Durante los muestreo que se realizaron en el día uno (después de la aplicación) y a los siete días post aplicación se encontró un gran incremento en la población de garrapatas en el área muestreada, donde los niveles de garrapatas incrementaron, poblaciones que sobrepasaron los niveles críticos, y por lo tanto se procedió a aplicar un producto químico a todos los tratamiento y así evitar enfermedades de anaplasmosis, abortos y entre otras enfermedades transmitidas por estos ectoparasitos en las vacas utilizadas en la investigación.

Bazan (2002) evaluó el efecto del hongo *Metarhizium anisoplae*, sobre el número y peso de garrapatas, período de preoviposición e incubación del huevo de *Boophilus microplus* en ganado bovino, bajo condiciones de establo, a la concentración de 1×10^8 conidias/ml. Encontró que los

tratamientos formados por el hongo y el acaracida, disminuyen el número de garrapatas, pero el hongo no presentó diferencias significativas con el testigo; el peso de la garrapata, el período de preoviposición e incubación del huevo no fue afectada por el hongo.

Aguilar 2010 encontró que la temperatura tiene un efecto en la muerte larvaria de la garrapata *Rhipicephalus microplus* donde evaluó el efecto de termo-tolerancia y eficacia in-vitro del hongo entomopatogeno *Metarhizium anisopliae* sobre el control de *Rhipicephalus microplus*, evaluando diferentes exposiciones a temperatura, mostrando una mayor mortalidad a temperaturas altas (37°C), obteniendo una mortalidad del 75% y a temperatura de 28 grados centígrados un 40% de mortalidad larvaria, esto nos dice que la temperaturas bajas hay menos agresividad por parte del hongo entomopatogeno.

VI. CONCLUSIONES

Los hongos entomopatógenos son organismos de importante valor ecológico al desempeñar funciones de regulación sobre acaros, quienes debido al mal manejo de plaguicidas realizado por el humano para su control se han convertido en plagas incontrolables y resistentes.

Bajo condiciones de laboratorio la cepa *Beauveria bassiana* (*Rhyssomatus*) presentó un 68% de mortalidad de larvas a los siete días después de ser impregnados con una concentración de 1×10^8 conidias/ml, considerándose la más patogénica, comparada con *B. Bassiana* (H4) y *metharizium anisopliae* que ocasionaron un 38% y un 13% de mortalidad respectivamente.

Factores ambientales como la temperatura, lluvias y humedad relativa probablemente influyeron en la mortalidad de las garrapatas, afectando el mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos y por ende no obtuvimos mortalidad a nivel de campo.

La *Boophilus microplus* es susceptible a los hongos entomopatógenos, quienes presentaron una alta mortalidad larvaria a nivel de laboratorio, pero no a nivel de campo en donde se debe considerar otros factores como presencia de lluvias, humedad relativa, temperatura y la optimización de la dosis.

VII. RECOMENDACIONES

Reactivar las cepas que se tienen en el cepario de la U.N.A. sobre garrapatas para incrementar la virulencia y obtener otras cepas de hongos entomopatogenos proveniente de garrapatas.

Evaluar en laboratorio diferentes concentraciones de conidias y encontrar la DL50, así como diferentes tiempos en el proceso de inmersión u otro tipo de aplicación del hongo.

Realizar el ensayo a nivel de campo en diferentes épocas del año especialmente verano con las mismas cepas evaluando diferentes concentraciones de conidias para optimizar la dosis; así como llevar un registro de la presencia de lluvias, humedad relativa y temperatura de los hongos entomopatogenos.

Se deben realizar más pruebas de patogenicidad en distintos estadios y especies de las garrapatas.

Realizar las pruebas a nivel de campo manteniendo las unidades experimentales (vacas) estabuladas sin posibilidades de una nueva reinfesta y así tener un mejor control y manejo de las garrapatas inoculadas.

Utilizar combinaciones entre las diferentes cepas de hongos entomopatogenos y observar grado de virulencia, haciendo sobre la forma de acción entre las cepas combinadas y las normales.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Acosta Vanegas JM. 2006. Evaluación de hongos entomopatogenos como controladores biológicos de *Scutigerella immaculata* (en línea). Tesis. Facultad de ciencias carrera de microbiología agrícola y veterinaria. Universidad Pontificia Javeriana. Bogota D.C. Consultado 20 nov. 2013. Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis243.pdf>

Avila Velasquez R. 2011. Efecto de *Beauveria bassiana* (Bals.Vuil.) y *Metarizium anisopliae* (Metch. Sorok.) Sobre el picudo negro de las musáceas *Cosmopolites sordidus*. Tesis Ing. Agr. Universidad Nacional de Agricultura. Catacamas, Olancho, Honduras. 51 pp.

Alonso Díaz, MA; Rodríguez Vivas, RI; Fragoso Sánchez, H; Rosario Cruz R. 2006. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas (en línea). Consultado 26 abri. 2013. México. Disponible en:
http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?pid=S0301-732X2006000200003&script=sci_arttext

Aguilar Barradas JA. 2010. Termo-tolerancia y eficacia in vitro del hongo entomopatogeno *Metarhizium anisopliae* (ma14) sobre el control de larvas de *Rhipicephalus (boophilus) microplus* (en línea). Tesis. Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Veracruzana. Veracruz, Veracruz. Mexico. Consultado el 18 de may. 2013. Disponible en:
<http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/704/1/Tesis.pdf>

Bazán Tene M. 2002. Efecto de *Metarhizium anisopliae* en el control biológico de *Boophilus microplus* Canestrini en ganado bovino estabulado (en línea). Tesis. Facultad de ciencias biológicas y agropecuarias. Universidad de colima. Mexico consultado el 25 de mayo. 2013. Disponible en <http://bvirtual.ucol.mx/textoscompletos.php?autor=944&id=5797>

Bendeck Meléndez, N. 2012. Evaluación de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de *Boophilus microplus* en vacas del hato lechero de Zamorano. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica, Zamorano. Honduras. 18p (en línea). Consultado 18 de may. 2013. Disponible en <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1055/1/T3347.pdf>

Cañedo, V; Ames T; 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Lima, Perú. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima,(en línea). Perú. Consultado el 6 mayo. Disponible en <http://cipotato.org/library/pdfdocs/AN65216.pdf>

CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 2001. Produccion, uso y fcontrol de calidad de hongos entomopatogenos en Nicaragua (en línea). CR. Consultado 5 mayo. 2013. Disponible en <http://web.catie.ac.cr/informacion/rmip/rev63/pag95-103.pdf>

Díaz Díaz H. 2012. Efecto de dos aislados de *Beauveria bassiana* y uno de *Metarhizium anisopliae* sobre *Plutella xylostella* bajo condiciones de campo y de laboratorio, Tesis Ing. Agr. Universidad Nacional de Agricultura. Catacamas, Olancho, Honduras C.A. 88 pp.

Drugueri, L. 2002. Garrapatas del ganado bovino. (En línea). Consultado el 18 de enero 2010. Disponible en. <http://www.zoetecnocampo.com/forog/Forum2/HTML/000226.html>

Fernandez Ruvalcaba M; Zhiouab E; Garcia Vasquez A. 2005. Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Boophilus microplus* sensible y resistente a los organofosforado (en línea). Mexico. consultado el 3 de junio. 2013. Disponible en: <http://ibsa.mx/~inifap4/index.php/Pecuarias/article/download/1359/1354>

Fernández Tondelli, J. 2006. Evaluación de la eficiencia del control de garrapatas (*Boophilus microplus*) con tres frecuencias de aplicación de BAZAM® (*Beauveria bassiana*). Tesis. Ing. Agr. Zamorano, Honduras. 22 p.

FUNICA (Fundación para el Desarrollo Tecnológico Agropecuario y Forestal de Nicaragua). 2003 1ªEd, Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía, Revisado por Dr. Falguni, Guharay, CATIE, Nicaragua. No. 55 p.3-5.

García García, MA; García, SC; Lesher Cordillo JM; Molina Martines RF. (s.f) Hongos entomopatogenos como una alternativa en el control biológico (en línea). Tabasco ME. Consultado 6 de mayo. 2013. Disponible en: http://www.publicaciones.ujat.mx/publicaciones/kuxulkab/ediciones/27/04_Hongos%20Entomopat%C3%B3genos%20como%20una%20alternativa.pdf

González J. (2001) Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 60 p.31-35.

Gutierrez Osorio J.D. 2006. Identificación de órganos blancos en garrapatas de las especies de *Boophilus microplus* para anticuerpo-antigarrapatas de bovinos inducidos por el inmunogeno tick-vac Mk del laboratorio limor de Colombia S.A. mediante métodos de inmunoperoxidasada.(en línea). Tesis. Facultad de ciencias microbiológicas industrial. Universidad javeriana pontificia. Bogota. Colombia. Consultado el 7 de mayo. Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis265.pdf>

Hernández Hernández, EO. 2010. Resistencia de las garrapatas a garrapaticidas de contacto en ganado de leche en el departamento de Ocotepeque. Tesis Ing. Agrónomo. Universidad Nacional de Agricultura, Catacamas Olancho, Honduras C.A.

Lopez Lastra CC. y Scorsetti, A. C 2007. Review of Entomophthorales (Zygomycota: Zygomycetes) fungal pathogens of insects from Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* (en línea). vol.42, n.1-2 pp. 33-37 Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S185123722007000100005&lng=es&nrm=iso. ISSN 1851-2372.

Lopez Elkin; Lopez Gustavo; Orduz S. 2009. Control de la garrapata *Boophilus microplus* con *Metarhizium anisopliae*, estudios de laboratorio y campo (en línea) .*Rev. Colomb. Entomol.*, Bogotá,. v. 35, n. 1, consultado el 17 de junio. 2013. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v35n1/v35n1a08.pdf>

Manzano-Román, R; Díaz-Martín, V; Pérez-Sánchez, R. 2012. Garrapatas: Características anatómicas, epidemiológicas y ciclo vital, detalles de la influencia de las garrapatas sobre la producción y sanidad animal (en línea). Salamanca, España. Consultado 27 abri. 2013. Disponible en:

http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/Bovinos_garrapatas_tristeza/160-garrapatas.pdf

Marcelino Bazán. 2002. Efecto de *Metarhizium anisoplae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en el control biológico de *Boophilus microplus* en ganado bovino estabulado. Tesis de maestro en ciencias aérea biotecnología. Tecoman, colima, mexico.

Márquez DL. 2003. Nuevas tendencias para el control de los parásitos de bovinos en Colombia (en línea). Colombia. Consultado 2 de junio. 2013. Disponible en: <http://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=5kIOGzVJZyoC&oi=fnd&pg=RA1-PA87&dq=da%C3%B1os+ocasionados+por+garrapatas&ots=35Sd6ySzhu&sig=3bBtKJFYGdJRlhyY9CgGaFqa3GU#v=onepage&q&f=false>

Pucheta Díaz, MA. Flores Macías, S; Rodríguez Navarro, M. de la Torre, 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos (en línea). Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de américa. Consultado 6 mayo, 2013. Disponible en <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2205982>

Rodríguez Vivas, RI; Rosado Aguilar, A; Basto Estrella, G; García Vásquez, ZF; Rosario Cruz, R; 2006. MANUAL TECNICO PARA EL CONTROL DE GARRAPATAS EN EL GANADO BOVINO (en línea). Yucatán México. Consultado 5 mayo. 2013. Disponible en http://www.ampave.org/archivos%20apoyo/Manual_tecnico.pdf

SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria), 2006. Garrapatas (En línea). Consultado el 15 de mayo de 2013. Disponible en: http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/Bovinos_garrapatas_tristeza/02-transmision_anaplasma.pdf

Tellez-jurado A; Cruz Ramírez MG; Mercado Flores Y; Asaff Torres A; Cuenca A.A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos (en línea). Rev. Mex. Mic, Xalapa. MX. Consultado 6 may. 2013. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802009000200007

ANEXOS

Anexo 1. Formato de toma de datos para mortalidad larval y presencia de micelio del hongo, bajo condiciones de laboratorio. N° día.....Fecha..... Nombre del muestrador...

Clave	Numero de larvas				Numero de larvas con micelio	total		% mortalidad
	Vivas 7:00 am	Muertas 7:00 am	Vivas 7:00 pm	Muertas 7:00 pm		vivas	muertas	
T1R1								
T1R2								
T1R3								
T1R4								
T1R5								
T1R6								
T1R7								
T1R8								
T1R9								
T1R10								
T2R1								
T2R2								
T2R3								
T2R4								
T2R5								
T2R6								
T2R7								
T2R8								
T2R9								
T2R10								
T3R1								
T3R2								
T3R3								
T3R4								
T3R5								
T3R6								
T3R7								
T3R8								
T3R9								
T3R10								
T4R1								
T4R2								
T4R3								
T4R4								
T4R5								
T4R6								
T4R7								
T4R8								
T4R9								
T4R10								

Anexo 2. Mortalidad de ninfas y adultos de *Boophilus microplus* sobre los hospederos.

Fecha:..... Días después de la 1º aspersión.....

claves	Numero de ninfas			Numero de adultos			Mortalidad	
	Vivas	Muertas		Vivos	Muertos		Ninfas	adultos
		Con micelio	Sin micelio		Con micelio	Sin micelio		
T1R1								
T1R2								
T1R3								
T2R1								
T2R2								
T2R3								
T3R1								
T3R2								
T3R3								
T4R1								
T4R2								
T4R3								
T5R1								
T5R2								
T5R3								

Anexo 3. Distribución espacial de los tratamientos en laboratorio

R1 T1	R2 T2	R3 T4	R4 T1	R5 T2	R6T3	R7T2	R8T3	R9T4	R10T3
R1 T3	R2 T1	R3 T1	R4 T2	R5 T1	R6T2	R7T1	R8T2	R9T1	R10T4
R1T4	R2 T3	R3 T3	R4 T4	R5 T4	R6T1	R7T4	R8T4	R9T2	R10T2
R1 T2	R2 T4	R3 T2	T4T3	R5 T3	R6T4	R7T3	R8T1	R9T3	R10T1

Anexo 4. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable mortalidad de larvas día 1.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.01	3	4.2E-03	0.93	0.4378 N.S.
trata	0.01	3	4.2E-03	0.93	0.4378 N.S.
Error	0.15	34	4.5E-03		
Total	0.17	37			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0045 gl: 34

trata	Medias	n	E.E.
3.00	1.00	10	0.02 A
2.00	1.00	8	0.02 A
1.00	1.00	10	0.02 A
4.00	1.04	10	0.02 A

Anexo 5. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable mortalidad de larvas día 2.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2.09	3	0.70	26.79	<0.0001 **
trata	2.09	3	0.70	26.79	<0.0001 **
Error	0.88	34	0.03		
Total	2.97	37			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0259 gl: 34

trata	Medias	n	E.E.
4.00	1.00	10	0.05 A
3.00	1.08	10	0.05 A
1.00	1.36	10	0.05 B
2.00	1.61	8	0.06 C

Anexo 6. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable mortalidad de larvas día 3.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2.12	3	0.71	20.06	<0.0001 **
trata	2.12	3	0.71	20.06	<0.0001 **
Error	1.20	34	0.04		
Total	3.32	37			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0353 gl: 34

trata	Medias	n	E.E.	
4.00	1.00	10	0.06	A
3.00	1.25	10	0.06	B
1.00	1.32	10	0.06	B
2.00	1.69	8	0.07	C

Anexo 7. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable mortalidad de larvas día 4.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2.94	3	0.98	19.40	<0.0001 **
trata	2.94	3	0.98	19.40	<0.0001 **
Error	1.72	34	0.05		
Total	4.66	37			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0506 gl: 34

trata	Medias	n	E.E.	
4.00	1.00	10	0.07	A
3.00	1.17	10	0.07	A
1.00	1.51	10	0.07	B
2.00	1.73	8	0.08	C

Anexo 8. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable mortalidad de larva día 5.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.56	3	0.19	4.43	0.0099 **
trata	0.56	3	0.19	4.43	0.0099 **
Error	1.43	34	0.04		
Total	1.99	37			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0420 gl: 34

trata	Medias	n	E.E.	
4.00	1.00	10	0.06	A
3.00	1.00	10	0.06	A
2.00	1.20	8	0.07	A
1.00	1.27	10	0.06	B

Anexo 9. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable mortalidad de larvas día 6.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.01	3	4.2E-03	0.93	0.4378 N.S.
trata	0.01	3	4.2E-03	0.93	0.4378 N.S.
Error	0.15	34	4.5E-03		
Total	0.17	37			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0045 gl: 34

trata	Medias	n	E.E.	
4.00	1.00	10	0.02	A
3.00	1.00	10	0.02	A
2.00	1.00	8	0.02	A
1.00	1.04	10	0.02	A

Anexo 10. Análisis de varianza y prueba de medias para la variable mortalidad a nivel de campo.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3948.93	6	658.16	280.07	<0.0001**
TRTA	3926.40	4	981.60	417.70	<0.0001**
RE	22.53	2	11.27	4.79	0.0428*
Error	18.80	8	2.35		
Total	3967.73	14			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 2.3500 gl: 8

TRTA	Medias	n	E.E.	
5.00	4.67	3	0.89	A
2.00	42.67	3	0.89	B
1.00	44.67	3	0.89	B C
4.00	44.67	3	0.89	B C
3.00	47.67	3	0.89	C