



**Evaluación del efecto ovicida de *Beauveria* spp sobre huevos de garrapata en  
invernadero**

Ligña Sangucho, Kevin Daniel

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniería Agropecuaria

Dr. Gómez Mendoza, Gelacio

29 de Agosto del 2023

## Reporte de verificación de contenido

**Copyleaks**  
Plagiarism report

**Evaluación del efecto ovicida de Bea...**

**Scan details**

Scan time: August 28th, 2023 at 16:53 UTC | Total Pages: 39 | Total Words: 9566

**Plagiarism Detection**

0%

Types of plagiarism	Words
Identical	5% 481
Minor Changes	1.8% 176
Paraphrased	2.2% 207
Orphaned Words	0% 0

**AI Content Detection**

N/A

Text coverage: AI text, Human text

**Plagiarism Results: (33)**

- Manual para la producción de hongos entomopatóg...** 2.2%

<https://repositorio.inia.gov.uy/handle/document/1000719521?pos=...>  
Manual No. 129 Manual para la producción de hongos entomopatógenos y análisis de calidad de bioformulados Instituto Nacional de Invest...
- Ensayo comparativo de híbridos comerciales de Maíz...** 1.1%

<https://repositorio.inia.gov.uy/handle/document/1000719521?pos=...>  
Gustavo Ferraris  
CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN COMPARATIVA DE CULTIVARES DE MAÍZ EN LA LOCALIDAD DE COLÓN (BS AS). CAMPAÑA 2018/19 INTA EEA Pergamino...
- Microsoft Word - 16.doc** 1%

<http://www.ijast.ac.in/journal/vol.5-no.6-december-2015...>  
HRD  
International Journal of Applied Science and Technology Vol. 5, No. 6, December 2015 Assessment of the implementation Degree in HandIn...



GELACIO ANTONIO GÓMEZ MENDOZA

**Dr. Gómez Mendoza, Gelacio Mendoza.**

**DIRECTOR**



## DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

### CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

#### Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "**Evaluación del efecto ovicida de Beauveria spp sobre huevos de garrapata en invernadero**" fue realizado por el señor **Ligña Sangucho, Kevin Daniel** el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo, 29 de Agosto del 2023

Firma:



**Dr. Gómez Mendoza, Gelacio Mendoza.**

C. C. 1708691645



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**Responsabilidad de autoría**

Yo, **Ligña Sangucho, Kevin Daniel**, con cédula de ciudadanía No 1501118234, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Evaluación del efecto ovicida de Beauveria spp sobre huevos de garrapata en invernadero”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo, 29 de Agosto del 2023

**Ligña Sangucho Kevin Daniel**

C. C. 1501118234



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**Autorización de publicación**

Yo, **Ligña Sangucho, Kevin Daniel** con cédula de ciudadanía No 1501118234 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Evaluación del efecto ovicida de Beauveria spp sobre huevos de garrapata en invernadero”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Santo Domingo, 29 de Agosto del 2023

**Ligña Sangucho, Kevin Daniel**

**C.C.: 1501118234**

**Dedicatoria**

El presente trabajo va dedicado de manera especial y con mucho amor para mi madre Gloria Didiana Sangucho Soria por ser el mayor ejemplo de esfuerzo, sacrificio, humildad, sabiduría e inteligencia siendo así mi más grande inspiración para poder concluir esta etapa de vida profesional. De la misma manera a mi padre Joaquin Elias Ligña Tipan por ser un pilar muy fundamental para mí, darle gracias por sus consejos, su apoyo incondicional y su paciencia, todo lo que hoy soy es gracias a ellos.

A mis hermanos Sandra, Carlos, Marco y Julio que más que hermanos son mis verdaderos amigos. Por esos buenos consejos de vida y esa constante motivación y cariño durante todas las etapas de mi vida.

A toda mi familia que de una u otra manera formado parte de este logro que hoy en día lo estoy cumpliendo y que siempre desearon lo mejor para mí.

A todos mis amigos y amigas que a lo largo de la carrera fueron un grupo de apoyo y aquellos amigos que fueron muy cercanos a mí, me encuentro infinitamente agradecidos por ese gran apoyo.

Por todo eso y mucho más, este logro es para ustedes.

**Kevin.**

**Agradecimiento**

Quiero agradecer primero a Dios por guiarme por el camino correcto y ayudarme con paciencia, perseverancia y cuidado a lo largo de mi carrera universitaria.

Agradezco a mis padres y hermanos por el apoyo económico y espiritual que me brindaron cada día, son la inspiración en mi vida y la motivación para seguir adelante y nunca rendirme.

Gracias a la Universidad de las Fuerzas Armadas Espe-Sede Santo Domingo, que me enseñó muchos valores como el respeto, puntualidad y dedicación a lo largo de mi carrera, por estar siempre presta para el uso de las instalaciones y poderme formar como un profesional.

Estoy muy agradecido con cada uno de los docentes que han compartido conmigo sus conocimientos a lo largo de mi carrera, siempre me otorgaron sus conocimientos con esmero y dedicación en cada una de sus clases, me siento muy agradecido por brindarme sus enseñanzas y así poder estar listo para la vida laboral.

Al Doctor Gelacio Antonio Gómez por ser un excelente tutor de mi Proyecto de integración curricular, por el seguimiento y respaldo en el proceso investigativo.

A la Estación Experimental Santo Domingo del INIAP, por el acceso a las instalaciones y el acompañamiento de los encargados del Departamento de Protección Vegetal, Ingeniero

David Hidalgo, Ingeniera Mercedes Navarrete, Ingeniero Fabricio Zambrano.

Gracias de corazón a todos ustedes

**Kevin.**

## Índice de Contenido

Carátula.....	1
Reporte de verificación de contenido.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría .....	4
Autorización de publicación .....	5
Dedicatoria .....	5
Agradecimiento .....	6
Índice de Contenido.....	8
Índice de Tablas .....	12
Índice de Figuras.....	13
Resumen.....	15
Abstract .....	16
Capítulo I.....	17
Introducción.....	17
Objetivos .....	19

Objetivo General.....	19
Objetivos Específicos.....	19
Hipótesis .....	20
Hipótesis nula .....	20
Hipótesis alternativa .....	20
Capítulo II.....	21
Revisión de Literatura.....	21
Generalidades.....	21
Organización taxonómica <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	22
Ciclo de vida .....	24
Fase de vida libre o no parasitaria.....	25
Pre-oviposición .....	25
Oviposición .....	26
Post-oviposición.....	26
Incubación .....	26
Eclosión.....	26
Fase de encuentro.....	27
Fase parasitaria.....	27

	10
Impacto económico .....	28
Hongos entomopatógenos.....	28
Hongos entomopatógenos en el control biológico .....	29
Beauveria bassiana .....	29
Reactivación del hongo .....	32
Evaluación del efecto ovicida sobre huevos .....	32
Dosis letal media (DL50).....	32
Tiempo letal medio 50 (TL50) .....	32
Concentración letal 90 (CL90) .....	33
Bioensayos.....	33
Mulch .....	33
Capítulo III.....	34
Materiales y Métodos .....	34
Ubicación del lugar de la investigación .....	34
Ubicación política.....	34
Ubicación geográfica .....	34
Ubicación ecológica.....	35
Materiales.....	35

	11
Métodos .....	36
Diseño experimental .....	37
Tratamiento a comparar.....	37
Tipo de diseño .....	38
Análisis estadístico .....	38
Croquis del diseño en campo .....	39
VARIABLES MEDIDAS.....	39
Efecto ovicida .....	39
Determinación de la concentración de esporas mediante conteo de conidias.....	39
Dosis letal media (DL50) y su uso en campo (DL90) .....	40
Tiempo Letal Medio (TL50).....	41
MÉTODOS .....	41
Fase de laboratorio.....	41
Fase de campo.....	45
Capítulo IV .....	46
Resultados y Discusión .....	46
Prueba antagonista entre Beauveria spp y huevos de garrapata.....	46
Dosis infectiva ideal en el sustrato estéril y no estéril .....	47

	12
Dosis infectiva en sustrato estéril.....	48
Dosis infectiva en sustrato estéril.....	49
Factor de correlación para Dosis letal de <i>Beauveria</i> spp en suelo estéril .....	50
Factor de correlación de la Dosis letal en suelo no estéril .....	52
Número de huevos infestados y concentración de conidias en el suelo.....	54
Capítulo VI .....	58
Conclusiones.....	58
Recomendaciones.....	59
Bibliografía .....	60

### Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> Organización taxonómica ( <i>Rhipicephalus microplus</i> ) .....	22
<b>Tabla 2</b> Condiciones para el crecimiento de <i>B. bassiana</i> .....	30
<b>Tabla 3</b> Insumos, materiales y equipos utilizados en laboratorio.....	35
<b>Tabla 4</b> Insumos, materiales y equipos utilizados en campo .....	36
<b>Tabla 5</b> Factores y niveles propuestos en la evaluación del efecto ovicida de <i>Beauveria</i> spp sobre huevos de garrapata en invernadero .....	37

<b>Tabla 6</b> Tratamientos evaluados para obtener la Dosis Letal media (DL 50) y de uso en campo (DL90).....	37
<b>Tabla 7</b> Tratamientos evaluados para obtener el Tiempo Letal Medio (LT50) .....	38
<b>Tabla 8.</b> Dosis infectiva ideal en sustrato estéril y no estéril.....	47
<b>Tabla 9.</b> Infestación y mortalidad de huevos de garrapata <i>R. microplus</i> por el efecto de <i>B. bassiana</i> a diferentes concentraciones.....	52
<b>Tabla 10.</b> Infestación y mortalidad de huevos de garrapata <i>R. microplus</i> por el efecto de <i>B. bassiana</i> a diferentes concentraciones.....	53
<b>Tabla 11.</b> Relación huevos infectados y concentración de conidias en el suelo .....	54

### Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Taxonomía de las garrapatas.....	21
<b>Figura 2</b> Ciclo biológico de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	25
<b>Figura 3</b> Formas de infección y muerte de los hongos sobre <i>R. microplus</i> .....	31
<b>Figura 4</b> Ubicación geográfica de la zona de investigación.....	34
<b>Figura 5</b> Distribución de las unidades experimentales del ensayo .....	39
<b>Figura 6</b> Evaluación de relación efecto ovicida hongo entomopatógeno-huevo. ....	46
<b>Figura 7</b> Dosis infectiva ideal en sustrato estéril y no estéril .....	49
<b>Figura 8</b> Determinación dosis letal respecto a porcentaje de infestación y mortalidad en suelo estéril.....	50

<b>Figura 9.</b> Determinación dosis letal respecto a porcentaje de infestación y mortalidad en no suelo estéril.....	52
<b>Figura 10.</b> Observación de estructuras de <i>Beauveria bassiana</i> en dosis letal en sustrato estéril no estéril .....	53
<b>Figura 11.</b> Tiempo letal (50) en relación de numero huevos infectados y conidias presentes en el suelo.....	55
<b>Figura 12.</b> Tiempo letal (DL) concentración conidias en el suelo. ....	56
<b>Figura 13.</b> Determinación UFCs de <i>Beauveria bassiana</i> en el sustrato.....	57

## Resumen

Las garrapatas son consideradas como uno de los principales ectoparásitos en el ganado bovino, debido a las pérdidas económicas directas que ocasionan y su potencial para transmitir enfermedades. Su control es complejo puesto que, en las zonas tropicales su ciclo biológico se ve favorecido. El presente estudio evaluó la eficacia del efecto ovicida de la cepa *Beauveria bassiana* sobre huevos de garrapata *Rhipicephalus microplus* en invernadero. Para lo cual, se aplicó un diseño complementado al azar (DCA) + 2 testigos, con cuatro repeticiones. Se inoculó con 10 ml de las siguientes concentraciones  $7.42 \times 10^7$  conidias/ml,  $7.42 \times 10^6$  conidias/ml,  $7.42 \times 10^5$  conidias/ml,  $7.42 \times 10^4$  conidias/ml,  $7.42 \times 10^3$  conidias/ml a cada grupo de 100 huevos en suelo estéril y no estéril cubierto con mulch. Se obtuvo como resultado una dosis letal 20 (DL20) con una concentración de  $7.42 \times 10^7$  conidias/ml del hongo entomopatógeno a los seis, ocho y diez días tanto para suelo estéril y no estéril, determinándose que en el suelo no estéril se obtiene una mayor infestación. En la determinación del tiempo letal medio se estableció que las conidias pueden sobrevivir durante veinte días en el sustrato; concluyendo que controlan otros estados biológicos del ectoparásito debido a que en el suelo permanecen a concentraciones  $\times 10^7$  conidias/ml que controlan estadios de larvas y ninfas. Estos resultados indican que *Beauveria bassiana* puede ser incluido como un bioacaricida en Manejo Integrado de Garrapatas (MIG) porque reduce un 20 % de huevos y de esta manera se reduce el número de individuos del ectoparásito.

**Palabras clave:** DL20, *Beauveria bassiana*, *Rhipicephalus microplus*, mulch, MIG.

### Abstract

Due to the big economic loss and the ability to transmit diseases, ticks are considered one of the major ectoparasite infesting cattle. Tropical environments favor its biological cycle making it difficult to control. This study evaluated the egg killing effect of the *Beauveria bassiana* strain on *Rhipicephalus microplus* eggs in a greenhouse. A completely randomized design plus two witness groups were used repeating the tests four times. 10 ml of different concentrations were inoculated:  $7.42 \times 10^7$  conidias/ml,  $7.42 \times 10^6$  conidias/ml,  $7.42 \times 10^5$  conidias/ml,  $7.42 \times 10^4$  conidias/ml,  $7.42 \times 10^3$  conidias/m to each group of 100 eggs in fertile soil and non-fertile soil covered with mulch. As a result, a lethal dose 20 (LD20) with a  $7.42 \times 10^7$  conidias/ml concentration of the entomopathogenic fungi at day six, eight and ten for both kinds of soils was obtained. Non-sterile soils were determined to have more infestation than sterile soils. It was established that the average lethal time (LT) for the conidias living in the substrate was around 20 days. The concentration ( $\times 10^7$ ) was enough to control nymph and larvae states. The reduction of 20% of the eggs indicated that the use of the fungi *Beauveria bassiana* can be considered as a bioacaricide for the integrated tick control program.

**Key words:** *LD20, Beauveria bassiana, Rhipicephalus microplus, mulch, integrated tick control program.*

## Capítulo I

### Introducción

La garrapata *Boophilus microplus* es un ectoparásito que representa una seria limitación para la introducción de ganado de leche o carne, en áreas endémicas. Los daños directos son: el declive en la producción láctea y cárnica, deterioro de las pieles, dificultad para la aclimatación en razas susceptibles y en los casos más complicados, la muerte (Lorenzo & María, 1999); además, es uno de los vectores más importantes, transmitiendo enfermedades al ganado como la anaplasmosis y la babesiosis. En América Latina, el microplus es abundante en el corredor mesoamericano hacia Venezuela y Colombia, y en el sur de Brasil y Argentina. La garrapata se asocia principalmente a los biomas del Chaco y la Pampa en Argentina, los Andes húmedos norcentrales, la selva atlántica (cordillera sur) y la vegetación húmeda mesoamericana (cordillera norte) (Buoattour et al., 2006).

La ganadería bovina es una de las piezas más dinámicas en el sector agropecuario ecuatoriano, puesto que promueve la economía rural mediante la oferta de productos que son fundamentales para la canasta básica, así como también, contribuyendo así con la seguridad alimentaria (Hidalgo, et al., 2020). Menciona Díaz (2015) que, en Ecuador, más del 75% de vacunos están distribuidos en áreas infestadas o con potencial de infestación, por garrapatas lo que genera pérdidas significativas; debido a la resistencia que ejercen sobre los ixodicidas en el subtrópico y trópico. Además, Díaz et al., (2006) y Ruiz y Blanco (2009) en su estudio determinaron un alto grado de resistencia a Cipermetrina, Amitraz y Deltametrina.

En búsquedas de soluciones para el control de poblaciones de garrapatas, se ha recurrido a la elaboración y producción de controladores que ofrezcan resultados más confiables en menor tiempo, y reduzcan también, la ovoposición de los adultos y los factores de resistencia. Entre estos se destacan los extractos de plantas recién preparados y los hongos entomopatógenos, los cuales han sido ampliamente utilizados para el control de plagas. Ya que la resistencia de *R. microplus* a los acaricidas se ha extendido desfavorablemente, es muy probable que, a futuro, se incremente el uso de productos biológicos a base de hongos entomopatógenos conforme se mejore la calidad y eficacia de los programas de manejo integrado (Moncada et al., 2015).

No obstante, se ha sugerido como alternativa de control a la acción que ejercen hongos entomopatógenos como biocontroladores para el manejo de las poblaciones de *Rhipicephalus microplus* (Fernandes et al., 2011); inclusive, en otras especies Ixodidae (Benjamín et al., 2002). De hecho, *Beauveria Bassiana*, se ha venido posicionado en el mercado como uno de los micoacaricidas con más uso a nivel mundial, ya que tiene la capacidad de perforar la capa de quitina y actuar dentro del artrópodo formando metabolitos como la basssanina para destruirlo (Agronet, 2022).

La búsqueda de biopesticidas basados en hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, se ha venido estudiando en el país por varios autores como, Bravo y Carranza (2022); Morocho (2019), donde se ha documentado el control que tiene *B. bassiana*, sobre las garrapatas a través de baños e *Isaria spp* para el control en ninfas a nivel de potrero. Así mismo, Fernandes et al., (2012), menciona el potencial de este tipo de hongos para tratar huevos, larvas, ninfas y adultos de varias especies de garrapatas. Por otro lado, Baioumy et al., (2021) revelan que *B. bassiana* en los ovocitos exhibieron cambios drásticos que afectaron su crecimiento y desarrollo.

El uso de hongos entomopatógenos representa una buena alternativa en el manejo y control de organismos vectores de enfermedades a animales, reduciendo el uso

de químicos perjudiciales para el medio ambiente (Agronet, 2022). Por esto, el 17 de julio de 2019 en el territorio nacional ecuatoriano, Agrocalidad (2022), aprobó el manual de procedimientos para el registro y control de agentes de control biológico, extractos vegetales, preparados minerales y semioquímicos.

Por otra parte, la Estación Experimental Santo Domingo del INIAP ha puesto a disposición el acceso a cepas de hongos entomopatógenos de *Beauveria bassiana* para el control de garrapatas, el cual ha generado excelentes resultados causando su muerte al día quinto y decimo (Bravo & Carranza, 2022). Por tal motivo, con la implementación de este estudio se espera disminuir el ciclo biológico de las garrapatas, y de esta manera contribuir con la reducción del uso de productos químicos y la resistencia a estos acaricidas sintéticos.

## **Objetivos**

### ***Objetivo General***

Determinar la eficiencia del efecto ovicidas de la cepa *Beauveria bassiana* sobre huevos de garrapata (*Rhipicephalus microplus*) en invernadero.

### ***Objetivos Específicos***

Determinar la Dosis Letal Media (DL50) y dosis letal (DL90) de *Beauveria spp.* para el control de huevos de garrapata en sustrato cubierto por mulch estéril.

Determinar el tiempo letal medio (TL50) para las conidias de *Beauveria spp.* partiendo de una concentración de esporas  $1 \times 10^7$  en sustrato cubierto por mulch estéril.

Determinar el tiempo de supervivencia de las conidias de *Beauveria spp.* en sustrato cubierto por mulch bajo invernadero.

## **Hipótesis**

### ***Hipótesis nula***

**H<sub>0</sub>:** La aplicación de *Beauveria spp.* al sustrato no tiene capacidad ovicida en huevos de garrapata, aunque este sea colocado posterior a su aplicación en el suelo en drench.

### ***Hipótesis alternativa***

**H<sub>1</sub>:** La aplicación de *Beauveria spp.* al sustrato tiene la capacidad ovicida en huevos de garrapata, aunque este sea colocado posterior a su aplicación en el suelo en drench.

## Capítulo II

### Revisión de Literatura

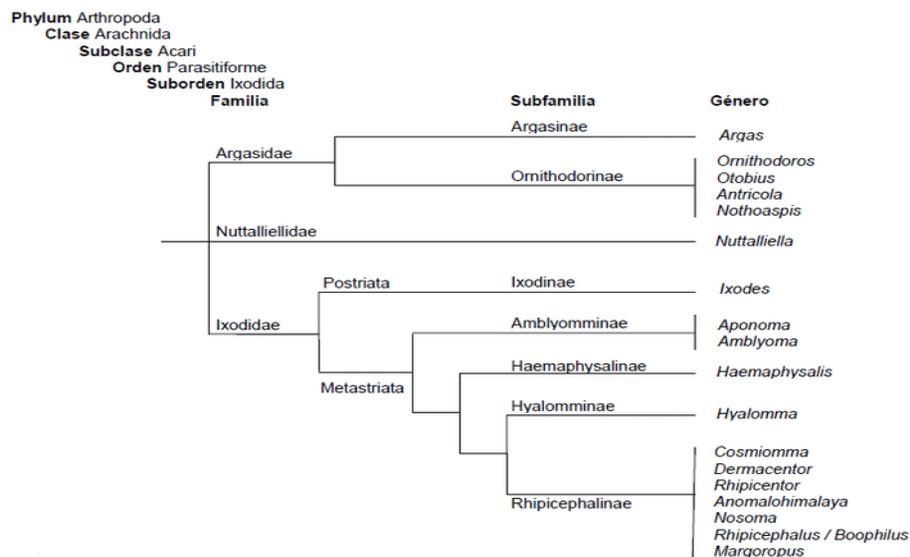
#### Generalidades

Las garrapatas son artrópodos que se caracterizan por succionar la sangre de varios tipos de animales, como aves, reptiles o mamíferos. En el mundo existen alrededor de 850 especies (Llória, 2002). Están distribuidas en un par de familias: Ixodidae (consistencia dura) y Argasidae (consistencia blanda) (Pulido et al., 2016).

No obstante, se ha catalogado a *Rhipicephalus microplus* como el ectoparásito más importante para la economía bovina ya que las pérdidas económicas que ocasiona están relacionadas directamente con la producción, ya sea de leche o de carne, puesto que reduce la ganancia de peso vivo, genera mortalidad, y daño en las pieles; lo que genera un efecto dominó debido al incremento del costo del control y los efectos de los hemoparásitos transmitidos (Diaz & Agustin, 2022).

#### Figura 1

Taxonomía de las garrapatas.



Nota: Tomado de Review on the biology of *Rhipicephalus sanguineus* (arthropoda, chelicerata)(Latreille, 1806). Álvares (2017).

### **Organización taxonómica *Rhipicephalus microplus***

La garrapata bovina anteriormente se denominaba *Boophilus microplus*, sin embargo, se consideró la reclasificación del género *Boophilus*, pasando a ser el subgénero de *Rhipicephalus*, producto de estudios filogenéticos, con bases en análisis de secuenciación genética y morfología. Por lo cual, este tipo de garrapata actualmente, se denomina *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Gomes, 2023). De tal manera que su clasificación taxonómica, es la siguiente:

#### **Tabla 1**

Organización taxonómica (*Rhipicephalus microplus*)

Clasificación	Tipo
Clase	Aracnido
Subclase	Acari
Orden	Paratisiformes
Suborden	Metastigmata
Familia	Ixodidae
Género	Rhipicephalus
Subgénero	Boophilus
Especie	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>

*Nota:* Tomado de Gomes (2023).

A continuación, se encuentran descritos los cuatro estados biológicos de este parásito: huevo, larva, ninfa y adulto.

**Huevo.** Estas estructuras miden aproximadamente 554  $\mu\text{m}$  de longitud y 409  $\mu\text{m}$  de ancho; y pesan alrededor de 51.76  $\mu\text{g}$  (Gallardo & Morales, 1999). Presentan una forma redondeada y coloración café rojiza; se depositan a nivel edáfico en grandes masas de huevos con una secreción glandular protectora, en cantidades que van de los 3000 a 2500 por hembra (Garza, 2007). No obstante, algunas especies ovipositan de manera individual. Las partes que conforman al huevo son: el corion, la capa de protección cérica, la membrana vitelina, el citoplasma y la parte nuclear. La mayoría de huevos en su parte basal son lisos y pueden adherirse en varios tipos de superficies (Costa & Ide, 2006).

**Larva.** Se conocen como piojillos y también presentan una coloración café rojiza, estas poseen solamente tres pares de patas. Su diámetro bordea los 0.9 mm y al igual que los huevos, se hallan en la tierra, pasto o las malas hierbas que crecen en las

praderas que han sido pastoreadas por animales infestados, según Rodríguez et al., (2021).

**Ninfa.** La coloración de este estado no varía, solo que, a diferencia de las larvas, las ninfas poseen un mayor tamaño y presentan un par adicional de patas, cantidad que es inherente de los arácnidos (ocho patas) y que las acompañará durante todo el ciclo biológico (Rodríguez et al., 2011).

**Adulto.** En esta fase, las garrapatas presentan dimorfismo sexual y son ovaladas de color grisáceo azulado o verde olivo con una cutícula brillante y arrugada; en el caso de las hembras están miden entre 10 a 13 mm, mientras que, el macho presenta menor tamaño (3-4 mm). En la superficie dorsal son lisas, mientras que, a nivel del margen posterior, muestra festones (Llòria, 2002).

### **Ciclo de vida**

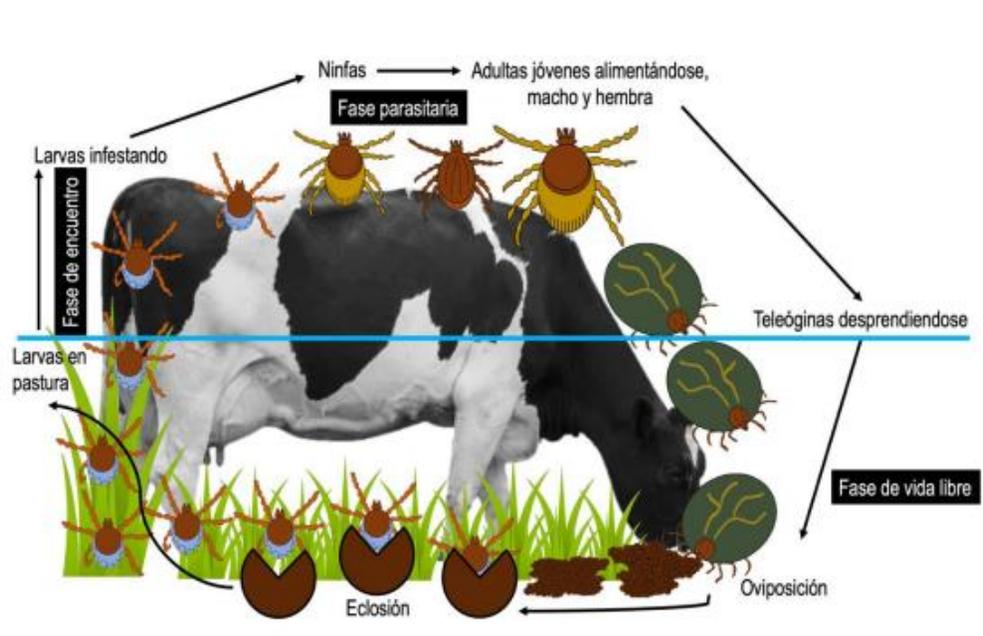
Las condiciones ambientales juegan un rol preponderante para el ciclo de vida de *Rhipicephalus microplus* (Diaz & Agustin, 2022). Durante su vida, solo utiliza un hospedero, que, por lo general, son los bovinos, pero también se han observado huéspedes caprinos, equinos, y ovinos.

El ciclo consta de cuatro estadios: huevo, larva (6 patas), ninfas (8 patas – sin madurez sexual), adultos (8 patas- madurez sexual). El ciclo finaliza cuando la garrapata se separa del hospedador; luego de haberse alimentado durante 19 a 25 días, en el caso de la hembra esta se hincha con la sangre y toma la denominación de “ingurgitada” cayendo, a continuación, al suelo para dar inicio a la puesta de huevos (Benavides et al., 2016).

La biología de estos arácnidos comprende tres fases, que son: la parasitaria, fase de encuentro y la tercera, que se conoce como la etapa parasitaria.

**Figura 2**

Ciclo biológico de la garrapata *Rhipicephalus microplus*.



Nota: Adaptado de Alonso y Salas (2021).

### Fase de vida libre o no parasitaria

Es el período en el que las garrapatas no están alimentándose de sangre en un animal huésped, sino que están en el entorno, buscando un huésped adecuado o esperando condiciones favorables para continuar su ciclo de vida; esta comienza con la separación de las hembras teleoginas después de haberse alimentado de la sangre del huésped, hecho que por lo general ocurre durante la noche y concluye con la aparición de larvas en las pasturas. De esta fase se derivan cinco etapas conforme a Díaz y Agustín (2022):

#### **Pre-oviposición**

Luego de que la garrapata se cae, esta rastrea el lugar en la búsqueda de sitios húmedos y cálidos que estén protegidos de la radiación solar para continuar con la

deposición de sus huevos. Para que sea posible el desarrollo la humedad debe estar en un rango situado entre 80 a 90 %, y la temperatura ambiente entre 28 a 30 °C, si se dan estas condiciones, esta etapa puede suceder entre 2 a 4 días. Sin embargo, cuando la temperatura se reduce por los meses fríos, puede demorar hasta 97 días (Diaz & Agustin, 2022).

### ***Oviposición***

La etapa comprende el tiempo en que la garrapata pone el primer huevo hasta que oviposita el último. La duración va de 4 a 60 días en función de los parámetros climáticos como la radiación solar, humedad relativa y la temperatura; por lo cual, durante la estación invernal puede doblarse el tiempo con respecto a la época de verano. Una garrapata puede ovipositar entre 1500 a 5000, y un promedio de 3000 huevos/garrapata (Diaz & Agustin, 2022).

### ***Post-oviposición***

Hace referencia al lapso que dura la puesta del último huevo hasta la muerte de la garrapata, hecho que puede demorar entre 2 a 15 días (Diaz & Agustin, 2022).

### ***Incubación***

Se refiere al período de tiempo que transcurre desde que los huevos son depositados por las hembras de garrapata hasta que eclosionan en larvas. La duración de la incubación puede variar según la especie de garrapata, las condiciones ambientales y otros factores, esto últimos pueden influir directamente sobre la calidad del embrión, lo que quiere decir que puede retardar su desarrollo o provocar su muerte (Diaz & Agustin, 2022).

### ***Eclosión***

Es el momento en el cual los huevos, que han sido depositados por las hembras, se abren y liberan a las larvas al entorno. En el contexto de las garrapatas, la eclosión marca el inicio de la siguiente etapa del ciclo de vida, que es la fase larval; demora de 14 a 60 días y su tasa puede superar el 80 % cuando las condiciones ambientales son favorables (Diaz & Agustin, 2022).

### ***Fase de encuentro***

Alude al período durante el cual, las larvas recién eclosionadas buscan y encuentran un huésped adecuado para alimentarse de su sangre. La detección se hace posible gracias a los quimiorreceptores que les permiten detectar gases como CO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>, ácido láctico y demás olores corporales (Flores, 2015). Este período se deriva en dos fases (Garza, 2007):

**Fase pasiva.** no necesariamente implica una falta de actividad biológica. Por ejemplo, las garrapatas pueden estar monitoreando el entorno en busca de señales que indiquen la presencia de un huésped, o pueden estar respondiendo a estímulos químicos, térmicos o vibratoriales que les indiquen que es el momento de reanudar su búsqueda activa; esta puede demorar entre 4 a 6 días.

**Fase de búsqueda.** ocurre principalmente en las etapas de larva y ninfa, después de que han eclosionado de los huevos. Las larvas y ninfas son muy pequeñas y necesitan alimentarse de la sangre de un huésped para crecer y desarrollarse. Una vez que las garrapatas han detectado la presencia de un huésped, se dirigen hacia él y buscan un lugar para adherirse. Esta fase de búsqueda puede ser crucial para el éxito de las garrapatas en su ciclo de vida, ya que, si no encuentran un huésped adecuado en el que alimentarse, su desarrollo y ciclo de vida pueden verse afectados.

### **Fase parasitaria**

La fase parasitaria es especialmente relevante en las etapas de ninfa y adulto de las garrapatas, puesto que, en estas etapas, las garrapatas requieren una cantidad significativa de sangre para completar su desarrollo y madurez. Durante esta fase, las garrapatas se fijan a la piel del huésped utilizando sus piezas bucales especializadas y perforan la piel para acceder al torrente sanguíneo. En esta fase la garrapata desarrolla los estadios: larva, ninfa y adulto (Marquez, 2003).

### **Impacto económico**

Las garrapatas tienen un impacto económico significativo en la industria ganadera, en particular en el ganado bovino. Estos ectoparásitos pueden causar una serie de problemas que afectan tanto la producción como la salud de los animales, lo que a su vez se traduce en pérdidas económicas considerables (Benavides, et al., 2016). Las pérdidas directas se asocian a la introducción o crecimiento de la población del parásito en conjunto con la proporción de animales parasitados que expresan la enfermedad. No obstante, el efecto negativo se da a medida que las garrapatas se incrementan, hecho que ocurre con el primer contacto hemoparasitario (Coleman, et al., 2001).

Cuando se introducen en animales susceptibles la pérdida directa tiende a incrementarse, ocasionando niveles de mortalidad dramáticos, abortos, afección en la parte reproductiva tanto en machos y hembras, así como también generando molestias que afectan el bienestar animal (Mahoney & Ross, 1972).

### **Hongos entomopatógenos**

Los hongos entomopatógenos son un grupo especial de microorganismos que habitan en el suelo que infectan y matan insectos y otros artrópodos a través de la penetración de la cutícula. Actualmente se utilizan como agentes de biocontrol contra plagas de insectos vegetales y juegan un papel vital en su manejo (Eliopoulos y otros,

2022). Según Sepulveda (2019) los hongos más destacados en este ámbito son: *Beauveria*, *Paecilomyces* y *Metarhizium*.

El control biológico mediante hongos entomopatógenos, ha sido intensamente estudiado durante el último siglo; de manera general, se han desarrollado métodos inundativos, con la inoculación masiva de hongos para lograr un efecto eficaz en plagas. Para la obtención de las cepas de estos hongos, se toman muestras de terrenos sin alteraciones producidas por el hombre, así como también a partir de muestras de insectos parasitados, estas cepas posteriormente se purifican (Sepulveda, 2019).

Sin embargo, la eficiencia de los hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas, puede ser afectado por factores externos abióticos (humedad relativa, temperatura, radiación, e interacción con otros organismos biocontroladores) según Velasquez et al., (2014).

### **Hongos entomopatógenos en el control biológico**

Actualmente es reconocido el rol que juega la biodiversidad en los agroecosistemas puesto que ofrece varios servicios ecosistémicos. Los hongos entomopatógenos, como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, se han posicionado como los principales enemigos naturales de las plagas en los agroecosistemas, por lo que, son considerados como los antagonistas más aceptados para el futuro sostenible de la agricultura (Meiling & Eilenberg, 2007). Motta y Murcia (2011) manifiestan que el 80% de las enfermedades que ocurren naturalmente sobre los insectos en el ecosistema son provocadas por la acción de microorganismos, eso sí, dependiendo de la susceptibilidad que presente el hospedero o a su vez, de la asociación patógeno-hospedero, ya que se da una selección natural especializada con respecto al hospedador.

### ***Beauveria bassiana***

*B. bassiana* es un hongo sin una forma específica, que genera conidios hialinos en forma esférica. Es reconocido como un patógeno con especificidad para artrópodos (Hoog, 1972). Pertenece a la clase Deuteromycetes, de la familia Monilaceae. Este hongo tiene la capacidad de habitar y proliferar en diversas condiciones climáticas, geográficas y ambientales en todo el planeta, por lo que puede afectar hasta 700 especies insectiles, por lo que, se ha evaluado su potencial a nivel de laboratorio (Vivas, 2003).

Recientemente, se han realizado esfuerzos para evaluar el potencial de los hongos como agentes de biocontrol contra importantes vectores artrópodos (Guan et al., 2013). Se ha demostrado que, *Beauveria bassiana*, es muy eficiente en el control de garrapatas, especialmente sobre *R. microplus*, manifestó Del Pozo et al., (2018). El estudio de Guan et al., (2013), determinó, que las hembras de *R. microplus* tratadas con *B. bassiana* (B.bAT17) redujeron significativamente la cantidad de puesta de huevos; y la mayoría morían antes de que pudieran comenzar a ovipositar

**Tabla 2**

Condiciones para el crecimiento de *B. bassiana*

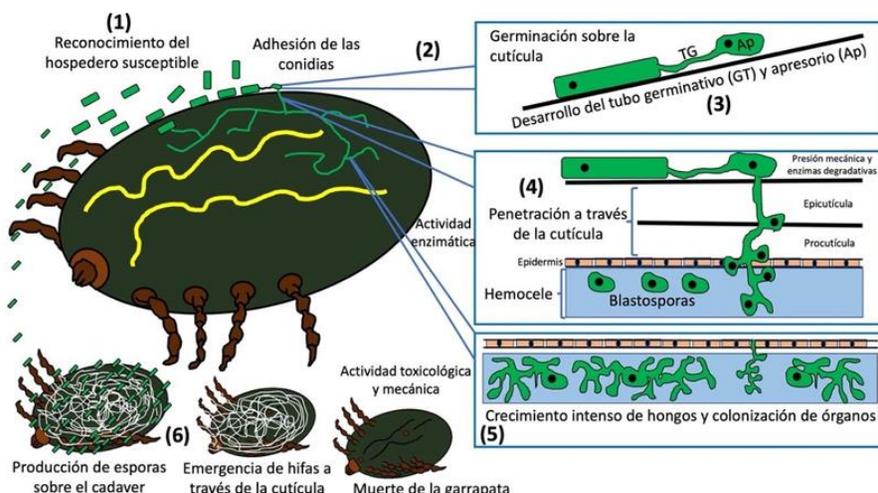
Factor	Descripción
pH	Entre 5.7 y 5.9
Temperatura óptima	25 y 28 °C
Rangos máximos de temperatura	8 a 35 °C
Humedad relativa óptima	94%
Límites de humedad relativa	34 a 100%
Necesidad nutricional	Fuentes de nitrógeno: peptona; fuentes de energía: sacarosa, glucosa, almidón, pectina.
pH	Entre 5.7 y 5.9
Temperatura óptima	25 y 28 °C

*Nota:* Tomado de Fernandez (2020) y Bermeo (2022).

Mecanismo de acción. Durante la fase de patogenia, las hifas en desarrollo de *B. bassiana* liberan enzimas hidrolíticas extracelulares que ayudan a la penetración de hongos en el tegumento de los insectos o artrópodos y factores de virulencia que desactivan y desmoronan el sistema inmunitario del huésped, lo que conduce a su muerte (Keswani et al., 2015). La forma de infección y muerte de los hongos sobre *Rhipicephalus microplus* se divide en seis etapas (Alonso & Salas, 2021): reconocimiento, adhesión, germinación, penetración, invasión y colonización; muerte de la garrapata y emergencia sobre la cutícula.

### Figura 3

Formas de infección y muerte de los hongos sobre *R. microplus*



Nota: Recuperado de Alonso y Salas (2021).

El desarrollo de la micosis se desarrolla en tres etapas. La inicial y también la más crítica, es la adhesión de la conidia en conjunto con la penetración de la cutícula que se da por acción de hidrolasas (quitinas y lipasas) encargada de degradar la cutícula y atravesar la barrera antimicrobiana del hospedero, además de la fuerza mecánica ejercida por las hifas del hongo. En la siguiente etapa las hifas penetran en la

hemolinfa, crecen dentro de los órganos internos y salen al exterior del cadáver del hospedador para formar el micelio y los conidios (Holder & Keyhami, 2005).

*B. bassiana* produce una variedad de toxinas, que son metabolitos secundarios como beauvericina, bassianina, bassianolida, beauverolidas, tenellin, oosporein y ácido oxálico. Estas toxinas ayudan a *B. bassiana* para parasitar y matar a los anfitriones (Cheng et al., 2021).

### **Reactivación del hongo**

Para desarrollar programas de control de insectos plagas mediante hongos entomopatógenos es necesario obtener formulaciones que conserven sus características al ser utilizadas en campo (Aparecida et al., 2006). Los estudios determinan la viabilidad y eficacia de estos microorganismos para obtener un producto de alta calidad al final, no obstante, para que estos sean reactivados en el insecto al que se dirigen se debe tener en cuenta sus propiedades patogénicas y su virulencia potencial (Bustillo & Patricia, 2002).

### **Evaluación del efecto ovicida sobre huevos**

#### ***Dosis letal media (DL50)***

Es un término utilizado en toxicología y farmacología para medir la cantidad o dosis de una sustancia que se necesita para causar la muerte del 50% de un grupo de organismos o sujetos de prueba en un período de tiempo determinado. En otras palabras, es una medida de la toxicidad aguda de una sustancia, como un químico, medicamento o veneno (Organización Marítima Internacional, 2006) (Secretaría de Gobernación Mexicana, 1988).

#### ***Tiempo letal medio 50 (TL50)***

Es un término que se utiliza para medir la letalidad o toxicidad de una sustancia al referirse al tiempo necesario para que el 50% de un grupo de organismos o sujetos de prueba mueran debido a la exposición continua o repetida a dicha sustancia (Bermeo, 2022).

### ***Concentración letal 90 (CL90)***

Es un término que se utiliza para medir la letalidad o toxicidad de una sustancia al referirse a la concentración necesaria de esa sustancia en un medio (como el agua o el aire) para causar la muerte en el 90% de los organismos o sujetos de prueba expuestos durante un período de tiempo específico (Delgado, 2016).

### **Bioensayos**

Es un experimento o prueba diseñada para evaluar el efecto de una sustancia o un agente en organismos vivos. Los bioensayos se utilizan comúnmente en diversas áreas de la ciencia, como la toxicología, la ecología, la farmacología y la investigación biomédica, para determinar la respuesta biológica a diferentes condiciones o estímulos (Contero & Felicita, 2006). Se utilizan para el monitoreo de causas y sus efectos (Correa, 2006). Los resultados pueden incluir beneficios, pero también aspectos negativos, ocasionando la toxicidad o muerte del organismo evaluado (Cervantes et al., 2007).

### **Mulch**

Se refiere a una capa de material orgánico o inorgánico que se coloca sobre el suelo en jardines, huertos u otras áreas plantadas. El mulch tiene varios propósitos beneficiosos para las plantas y el suelo, y es ampliamente utilizado en la jardinería y la agricultura. El mulch puede ser de diferentes tipos, como materiales orgánicos (por

ejemplo, restos de poda, hojas, paja, corteza de árbol) o materiales inorgánicos (como plástico, piedras o grava) (Frutos, 2015).

### **Capítulo III**

#### **Materiales y Métodos**

##### **Ubicación del lugar de la investigación**

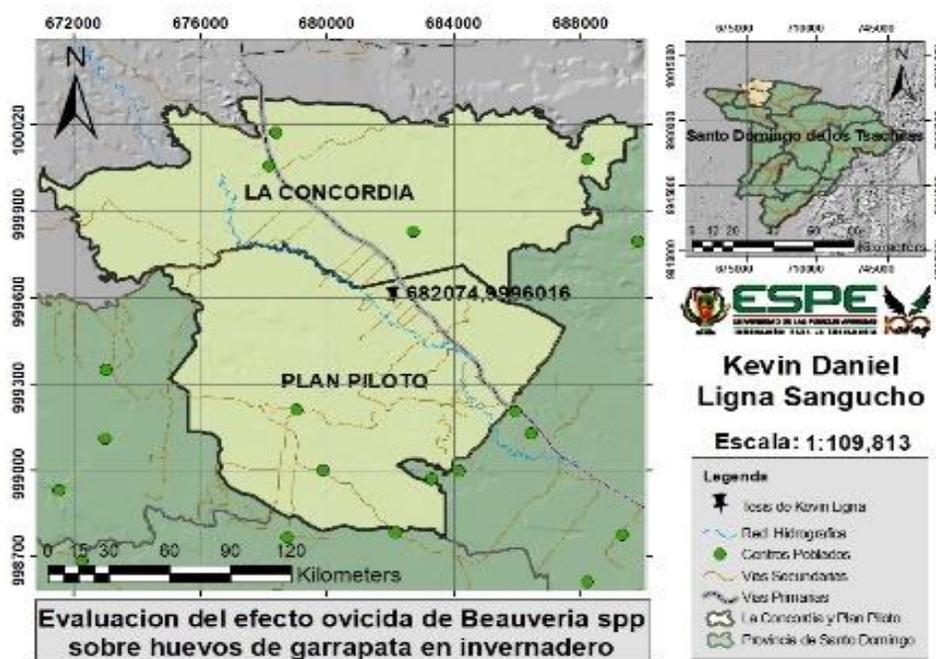
###### ***Ubicación política***

La investigación tuvo lugar en la Estación Experimental Santo Domingo, INIAP; la cual se encuentra ubicada en el Km 30 Vía Santo Domingo- Quinindé, Cantón la Concordia, Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

###### ***Ubicación geográfica***

##### **Figura 4**

Ubicación geográfica de la zona de investigación.



### Ubicación ecológica

Temperatura media anual: 24.2 °C

Precipitación media anual: 3446.4 mm/año

Heliofanía media anual : 704.4 horas luz/año

Humedad relativa : 87 %

Altitud : 300 msnm

Topografía : Regular

Suelos : Franco Arenosos

Zona de vida Holdridge : Bosque Húmedo Tropical (bh-T)

### Materiales

#### Tabla 3

Insumos, materiales y equipos utilizados en laboratorio

<b>Insumos</b>	<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>
Papa Dextrosa Agar	Vidriería de laboratorio	Cámara de flujo laminar
Alcohol	Asas	Autoclave
Cepas de Beauveria	Micropipetas	Microscopio
Tween	Puntas	Estereoscopio
Agua destilada	Guantes	Estufa
Cloranfenicol	Mascarillas	Balanza analítica
	Cofia	Centrifuga
	Cubre Zapatos	Refrigeradora
	Cámara de Neubauer	Agitador orbital
	Mechero	Destilador de agua
	Algodón	
	Papel toalla	
	Atomizador	
	Gradillas	
	Fundas de polipropileno	

**Tabla 4**

Insumos, materiales y equipos utilizados en campo

<b>Insumos</b>	<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>
Agua destilada	Vidriería de laboratorio	Termómetro
Agua filtrada	Jeringas de 10 ml	Computadora
Sustrato estéril	Papel aluminio	
Sustrato no estéril	Pipetas	
Mulch	Palillo de dientes	
	Fundas de vivero 6*8	

**Métodos**

### **Diseño experimental**

**Factor a evaluar.** Los factores que se estudiaron en el proyecto de integración curricular para determinar el efecto ovicida que tiene el hongo entomopatógeno fueron la dosis letal media (DL 50) y el uso en campo (DL 90) y el tiempo letal media (TL 50).

### **Tratamiento a comparar**

A continuación, en la tabla 5 se presentan lo factores y niveles propuestos:

**Tabla 5**

Factores y niveles propuestos en la evaluación del efecto ovicida de *Beauveria* spp sobre huevos de garrapata en invernadero

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>	<b>Descripción</b>
Dosis hongo	f0	0 conidias/ml (Testigo)
	f1	$1 \times 10^3$ conidias/ml
	f2	$1 \times 10^4$ conidias/ml
	f3	$1 \times 10^5$ conidias/ml
	f4	$1 \times 10^6$ conidias/ml
	f5	$1 \times 10^7$ conidias/ml
Sustrato		Suelo y mulch estéril
		Suelo y mulch no estéril

**Tabla 6**

Tratamientos evaluados para obtener la Dosis Letal media (DL 50) y de uso en campo (DL90).

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción del tratamiento</b>
T1	<i>Beauveria</i> $1 \times 10^3$ + Sustrato Estéril
T2	<i>Beauveria</i> $1 \times 10^4$ + Sustrato Estéril
T3	<i>Beauveria</i> $1 \times 10^5$ + Sustrato Estéril
T4	<i>Beauveria</i> $1 \times 10^6$ + Sustrato Estéril
T5	<i>Beauveria</i> $1 \times 10^7$ + Sustrato Estéril
T6	<i>Beauveria</i> $1 \times 10^3$ + Sustrato

T7	<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>4</sup> + Sustrato
T8	<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>5</sup> + Sustrato
T9	<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>6</sup> + Sustrato
T10	<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>7</sup> + Sustrato

**Tabla 7**

Tratamientos evaluados para obtener el Tiempo Letal Medio (LT50)

Tratamiento	Descripción del tratamiento
T1	<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>7</sup> + Huevos depositados en el día 0
T2	<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>7</sup> + Huevos depositados en el día 2
T3	<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>7</sup> + Huevos depositados en el día 4
T4	<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>7</sup> + Huevos depositados en el día 6
T5	<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>7</sup> + Huevos depositados en el día 8
T6	<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>7</sup> + Huevos depositados en el día 10
T7	<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>7</sup> + Huevos depositados en el día 12
T8	<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>7</sup> + Huevos depositados en el día 14

### **Tipo de diseño**

El diseño experimental Completamente al Azar DCA.

### **Análisis estadístico**

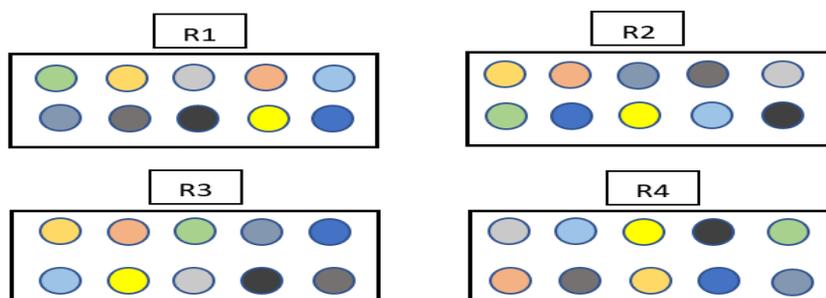
Para determinar el efecto ovicida sobre huevos de *Rhipicephalus microplus*, se utilizó un Diseño Completamente al Azar con cuatro observaciones, las diferencias significativas se discriminarán mediante Tukey ( $P \leq 0,05$ ); teniendo un total de 40 unidades experimentales en la obtención de la dosis letal media (DL 50) y de uso en campo (DL90), y 32 para la obtención del tiempo letal media (TL 50).

Además, se calculó la regresión entre los niveles de infestación y el porcentaje de mortalidad para determinar la concentración letal media (DL50) y los límites fiduciales (intervalos de confianza), se realizó mediante el análisis PROBIT.

## Croquis del diseño en campo

**Figura 5**

Distribución de las unidades experimentales del ensayo



## Variables medidas

### ***Efecto ovicida***

El efecto ovicida de los huevos de garrapata se evaluó mediante la observación continua de un mes, cada 5 días en el caso de la determinación de la dosis letal media (DL50) y el uso en campo (DL90) con las diluciones del hongo entomopatógeno ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  conidias/ml por kilo de suelo). En la determinación del tiempo letal medio (TL50) se evaluó cada dos días con la dilución del hongo entomopatógeno ( $1 \times 10^7$  conidias/ml por kilo de suelo). Se determinó el efecto ovicida contando el número de huevos infectados con presencia de estructura del hongo y al mismo tiempo los que no eclosionaron mediante la observación en el microscopio y estereoscopio de campo.

### ***Determinación de la concentración de esporas mediante conteo de conidias***

El conteo de conidias permite determinar la concentración de esporas. Se realizó sobre la cámara de Neubauer colocando 10  $\mu$ l de una solución seriada de la cepa de *Beauveria Spp*  $10^{-2}$  y se cubrió con el portaobjeto dejando reposar 5 minutos antes de proceder a realizar las lecturas en el microscopio. Con el objetivo 40X se realizó dos repeticiones de las lecturas de los cuatro cuadrantes, se ponderó las conidias presentes

en 5 cuadrantes y se obtuvo el total de datos. Por último, se aplicó la fórmula ajustada por Báez et al., (2019):

$$\text{Concentración de conidias} \left( \frac{\text{conidias}}{\text{ml}} \right) = \Sigma * 10000 * 16 * FD$$

Donde:

$\Sigma$ : promedio de las 20 lecturas por área de conteo.

PD: Factor de dilución (inverso de la dilución cuantificada).

16 y 10 000: Constantes para cuadrantes laterales.

### ***Dosis letal media (DL50) y su uso en campo (DL90)***

Utilizando la técnica de diluciones se asperjó 10 ml de dilución en concentraciones de  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  conidias/ml por kilo de sustrato, cada dilución constó con cuatro repeticiones tanto para sustrato estéril y no estéril, así mismo se dispuso de un testigo absoluto, en total se preparó 41 unidades experimentales. Las aplicaciones se realizaron 24 horas después de ubicar los huevos en las fundas de vivero. La dilución será elaborada al momento de la aplicación. Para determinar el volumen de las concentraciones se aplicó la fórmula ajustada por (Donoso, 2020).

$$\text{Dilución de las soluciones concentradas: } C1 * V1 = C2 * V2$$

Donde:

C1, C2: Concentración 1 y 2.

V1, V2: Volumen 1 y 2.

Las evaluaciones se realizaron cada cinco días durante un mes, observando la cantidad de huevos infectados mediante un estereoscopio de campo. En la última observación del mes los huevos fueron trasladados al laboratorio para respaldar los datos mediante fotografías de los mismos. La eficiencia de cada aplicación se determinó siguiendo la fórmula descrita por Higes et al., (1997).

$$E (\%) = VD \times 100 / VT$$

E (%): Eficiencia de aplicación.

VD: Número de huevos parasitados

Vt: Número total de huevos

### ***Tiempo Letal Medio (TL50)***

Se asperjó 10 ml de una solución de conidias en concentración  $10^7$  por funda de 1 kg de sustrato sin esterilizar y posteriormente se colocó 100 huevos por funda. Los huevos se colocaron en fundas separados con intervalos de dos días durante dos semanas con el fin de observar hasta cuantos días hay suficientes conidias para destruir los huevos.

Luego de 12 días de colocarse los huevos en las unidades experimentales fueron colectados y mediante confirmación visual se contó los huevos destruidos por hongos.

## **Métodos**

### ***Fase de laboratorio***

**Recolección de garrapatas.** Se colectaron garrapatas de la especie *Rhipicephalus microplus* en la fase teleogina directamente de la piel del bovino en la finca que se seleccionó, ubicada en el Km 23 vía los Bancos, las Mercedes, Provincia

de Santo Domingo De los Tsáchilas. Se procedió a realizar un examen visual determinando las zonas más afectadas en el animal, que generalmente son la ubre, tabla del cuello, flancos, abdomen, patas traseras, delanteras y en algunos casos las axilas y ancas. Identificado el ectoparásito, se realiza la extracción con el uso directo de los dedos índice y el pulgar, asimilando el uso de pinzas de disección, se tomó el cuerpo de la garrapata lo más cerca de la cabeza y la piel del animal, luego se aplica una fuerza de tracción constante y fijada perpendicular a la piel hasta finalmente extraer el ectoparásito, tomando en cuenta que no se quede alguna parte de la garrapata dentro de la piel del animal (Jimenez & De la Cruz, 2017), para luego ser transportadas al laboratorio de protección vegetal INIAP.

Se tomaron 40 garrapatas, sin aplicación de ixodicidas durante un periodo aproximado de 10 días, las mismas que se destinaron a la producción de huevos para la reactivación de *Beauveria spp*, estas fueron colocadas en cajas Petri.

**Producción de huevos.** Para la producción de huevos de garrapatas en el laboratorio se empleó la metodología utilizada por Bravo y Carranza (2022), se tomaron 10 garrapatas teleoginas por caja Petri durante 7 días, incubándose a una temperatura de 26 a 27°C con una humedad relativa del 70%, en el laboratorio de protección vegetal de la EESD. Se observó que las teleoginas ingurgitadas comenzaron con la ovoposición desde el día 2 de incubación.

**Reactivación del hongo y pruebas preliminares.** Con la obtención de huevos de garrapata se realizaron ensayos con la finalidad de reactivar el hongo entomopatógeno y determinar si existe alguna interacción de hongo entomopatógeno-huevo. Se colocó cierta cantidad de huevos en 5 cajas Petri cada una con su respectiva cámara de humedad con las cepas de *Beauveria spp*, que posee la EESD.

Se realizó una solución madre, la cual consistió en preparar 1 tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada, a esto se le añadió 1 gota de Tween 80 y se esterilizó en la autoclave por 20 minutos a una temperatura de 120 °C y una presión de 1 atmosfera. A continuación, se pesó 4gr de las cepas del hongo entomopatógeno ya incubadas, se preparó una suspensión de esporas colocando los 4 gr en el tubo de ensayo con la solución de Tween 80, para luego ser agitado en el vortex durante un minuto, con la ayuda de una jeringa de insulina se tomó 1 ml de la solución madre y se administró en todos los huevos de las cajas Petri.

**Repique de huevos contaminados con el hongo entomopatógeno.** Después de haber transcurrido 10 días posteriores a la aplicación de conidias de *Beauveria* spp. se observaron las primeras estructuras del hongo entomopatógeno. Con estos resultados se procedió a realizar el repique de los huevos contaminados por el hongo. Se preparo medios de cultivo (PDA), para lo cual, previamente se limpió correctamente la cámara de flujo laminar y se colocaron todos los materiales a utilizar: un mechero encendido, un asa, un vaso de precipitación con alcohol, cajas Petri con PDA anteriormente preparadas y se continuó con el proceso del repique. Todo el proceso se lo llevo a cabo con el mechero encendido, donde se abrió la caja que contenía los huevos infectados y con el asa previamente desinfectada se tomó los huevos contaminados por el hongo y se colocó en una nueva caja Petri con PDA hasta completar las cajas necesarias.

**Repique de cepas de hongos entomopatógenos.** Se tomó las mejores cepas del hongo entomopatógeno que se activó con la finalidad de purificarlo más, se realizó la toma de pequeñas muestras de cada cepa para ser sembradas en un nuevo medio de cultivo (PDA), al momento de realizar esta práctica, previamente se limpió correctamente la cámara de flujo laminar, se procedió a colocar todos los materiales a utilizar, se hizo uso del mechero encendido, un asa, vaso de precipitación con alcohol,

cajas Petri con medio de cultivo (PDA) y se continuo con el proceso de repique. Esta actividad se realizó cerca del mechero, se abrió la cepa y con el asa ya desinfectada se tomó un poco de micelio y se colocó en una nueva caja Petri con PDA hasta completar las cajas Petri que se necesita.

**Tiempo de supervivencia de conidias en el sustrato.** Se tomó 5 submuestras de 1 g del sustrato colonizado con la especie de hongo entomopatógeno; luego se colocó la muestra en un tubo de ensayo con 9 ml de solución estéril con Tween 80. La suspensión obtenida corresponde a la dilución  $10^{-1}$ . Posteriormente, se agitó fuertemente hasta que la muestra se disperse completamente. A partir de la dilución  $10^{-1}$ , realizar diluciones seriadas (hasta  $10^{-6}$ ), tomando una muestra de 1000ul y colocar en un nuevo tubo de ensayo, sucesivamente. Luego se sembró por triplicado 100ul de las diluciones obtenidas en el medio PDA, se extendió la muestra en toda la superficie de las cajas Petri, para a continuación dejarlas incubando a 24°C hasta que las colonias sean visibles para su conteo de cinco a siete días.

Se seleccionó la dilución adecuada para realizar el conteo, se recomienda que existan de 10 a 100 colonias por placa Petri; se contó el número de colonias en las tres placas Petri de la diluciónseleccionada y se promedió el número de colonias registrado en las tres repeticiones y calcular las UCF mediante la fórmula

$$\text{UCF / g o ml} = \text{Promedio \# de colonias} \times \text{factor de dilución.}$$

**Toma de datos.** Ya colocados los huevos y dispersado las diluciones establecidas en los tratamientos para determinar la DL50 Y DL90, se realizó toma de muestras cada 5 días por un mes, en cada toma los huevos fueron llevados al laboratorio para ser observados mediante el microscopio y estereoscopio para contabilizar el número de contaminados. Todas las tomas se realizaron de acuerdo al ciclo biológico del ectoparásito, tomando en cuenta que la eclosión va de 14 a 60 días

(Díaz & Agustín, 2022). Una vez terminado el ciclo del huevo, se contabilizó aquellos que no eclosionaron y se los observó en el estereoscopio para determinar si existían estructuras del hongo entomopatógeno.

Para determinar el TL50, en campo se tomó la muestra de suelo cada dos días y se colocó los huevos en cada muestra, este proceso se realizó durante 12 días, en el laboratorio mediante diluciones seriadas las muestras de suelo fueron dispensadas en PDA, de esta manera se determinó el número de colonias que existen en el sustrato. Para determinar el número de huevos infestados, estos fueron observados en el microscopio y estereoscopio y se estableció el tiempo en el que obtuvo más huevos contaminados.

### ***Fase de campo***

**Preparación del invernadero.** La Estación Experimental Santo Domingo INIAP, está equipada con invernaderos de reproducción vegetal, en el invernadero donde se realizó la investigación se preparó el lugar con una limpieza y correcciones de la estructura para evitar que algún factor tanto interno o externo influya en la investigación. Se estableció el área a ocupar de 7 m x 9 m y se armó una elevación de 20 cm con una base de tablas para evitar en contacto con organismos externos.

**Preparación del sustrato.** Se utilizó sustrato estéril y no estéril, para esterilizar se llenaron 5 fundas de 5 kg y se colocó en el autoclave por 1 hora. El sustrato no estéril se llenó directamente en fundas de vivero de 1 kg, para determinar la dosis letal media (DL50) y (DL90), se emplearon 40 fundas, 20 fundas con sustrato estéril y 20 sin esterilizar para obtener los 10 tratamientos y cuatro repeticiones. Para la determinar el tiempo letal medio (TL50), se emplearon 32 fundas de sustrato no estéril para obtener 8 tratamientos con 4 repeticiones.

**Esterilización del mulch.** Se utilizó como fuente de mulch 1 kg material vegetal de gramíneas. Se esterilizó por 1 hora en la autoclave. El material vegetal se utilizó después de la puesta de huevos, como una cubierta de la radiación solar para las conidias del hongo entomopatógeno y los huevos de la garrapata.

**Puesta de huevos en campo.** Una vez que se realizó la puesta de huevos de las hembras teleoginas, se contó 100 huevos bajo el estereoscopio, los cuales se pesaron en una balanza analítica para determinar su peso promedio. Tomando en cuenta la referencia del peso, se procedió a obtener las muestras para cada tratamiento y repetición, posteriormente se colocó en campo en las fundas con sustrato a capacidad de campo para mantener la humedad y la temperatura ideal para su viabilidad y se cubrió con el mulch. Se colocaron 73 muestras de 100 huevos en todos los tratamientos.

## Capítulo IV

### Resultados y Discusión

#### Prueba antagonista entre *Beauveria* spp y huevos de garrapata

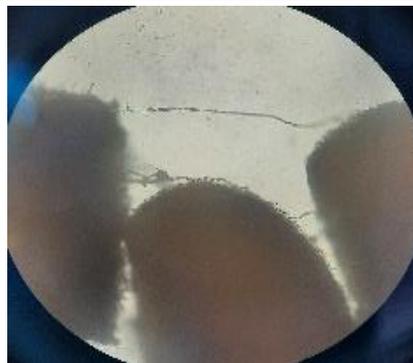
#### Figura 6

Evaluación del efecto ovicida, entre el hongo entomopatógeno y huevo.

---

#### Efecto del hongo entomopatógeno sobre los huevos (Días 10 a 11)

---



*Nota:* Evaluaciones del efecto ovicida entre *Beauveria* spp y huevo de garrapata en la primera fila corresponde a huevos totales ovipositados por una hembra adulta con estructura del hongo, determinándose estructuras a los días 10 a 11.

En los diferentes ensayos realizados en cajas Petri con huevos ovipositados ya inoculados con el hongo entomopatógeno se evidenció un crecimiento no equitativo en los huevos. En la figura 6 se muestra un porcentaje de huevos contaminados entre el día 10 al 11, con la ayuda del estereoscopio se observaron sus estructuras. Se mantuvo la observación del crecimiento del hongo hasta el día 21, para determinar si existía un mayor grado de infestación, en este caso se determinó que el hongo entomopatógeno tiene capacidad de penetrar la estructura del huevo entre el día 6 y 10 post-oviposición.

#### Dosis infectiva ideal en el sustrato estéril y no estéril

**Tabla 8.**

Dosis infectiva ideal en sustrato estéril y no estéril

Tratamientos	$\bar{x}$ huevos infestados	D.E.
<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>3</sup> + Sustrato estéril	6,54 <b>bcd</b>	± 2,25
<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>4</sup> + Sustrato estéril	5,71 <b>cd</b>	± 4,14
<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>5</sup> + Sustrato estéril	8,32 <b>bc</b>	± 4,14
<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>6</sup> + Sustrato estéril	7,21 <b>bcd</b>	± 3,13
<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>7</sup> + Sustrato estéril	14,14 <b>a</b>	± 6,88
<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>3</sup> + Sustrato no estéril	5,29 <b>cd</b>	± 2,66
<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>4</sup> + Sustrato <i>no estéril</i>	10,07 <b>b</b>	± 6,10
<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>5</sup> + Sustrato <i>no estéril</i>	4,25 <b>d</b>	± 1,48
<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>6</sup> + Sustrato <i>no estéril</i>	4,11 <b>d</b>	± 1,40
<i>Beauveria</i> 1*10 <sup>7</sup> + Sustrato <i>no estéril</i>	6,71 <b>bcd</b>	± 3,92

*Nota:* Medias con una letra común no son significativamente diferente, Tukey (p-Valor < 0,001).

En la Tabla 8 se presenta el efecto de las concentraciones de *Beauveria spp.*, Este proceso se realizó con la obtención de una solución madre de  $7.42 \times 10^8$ , a la cual se realizó diluciones seriadas, para obtener las concentraciones con las que se planteó el estudio las cuales fueron:  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ . Cada concentración consto de un tratamiento y cuatro repeticiones. Las muestras de huevos (100), fueron colocados 24 horas antes de la aplicación de las soluciones en el sustrato, ya aplicada las soluciones en los tratamientos y repeticiones fueron cubiertos con el mulch. Estos fueron observados cada 5 días en el estereoscopio de campo por un periodo 20 días.

### **Dosis infectiva en sustrato estéril**

En la tabla 8 se presenta los resultados de infestación de huevos de *R. microplus* en sustrato estéril, con las concentraciones:  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  conidias/ml del hongo entomopatógeno. Con relación a la eficacia de infestación, se determinó diferencias estadísticas entre la concentración  $1 \times 10^7$  respecto al resto de concentraciones con un promedio de 14.14 de huevos infestados por el hongo entomopatógeno, de esta manera se puede determinar que esta es la dosis infectiva ideal.

Existe patogenicidad por parte de hongos entomopatógenos sobre huevo de *R. microplus*. Rivera et al., (2021) determinaron en su estudio que cepas de *Metarhizium anisopliae* presentaron un mayor porcentaje de micosis que *Cordyceps bassiana*, donde se obtuvo un mayor porcentaje de micosis entre 90.80 y 100% para *Metarhizium anisopliae* y para *Cordyceps bassiana* un 34.55 y 89.63% estos resultados en huevo de 3 días de edad a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL.

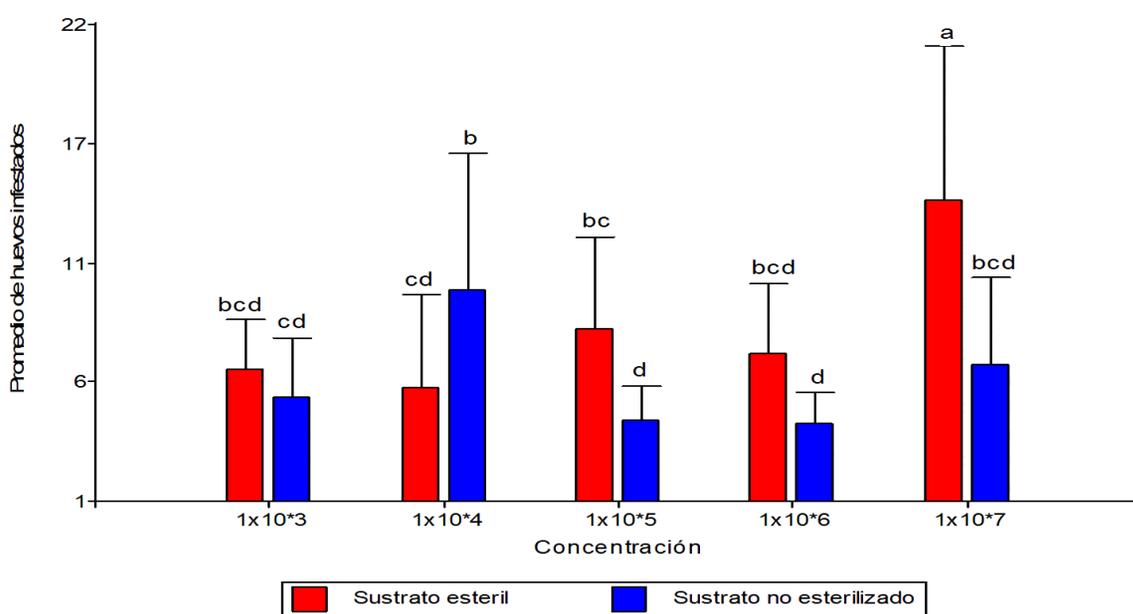
Un estudio realizado por Arguedas et al., (2008) determinaron la eficacia de *Metharrizium anisopliae* sobre la reducción de eclosión de los huevos *Boophilus microplus* que fueron tratados a una concentración de  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  estas

concentraciones fueron aplicadas en 1 gr de huevos. Obteniendo una eclosión de 82.73 % a una solución de  $10^8$ , y una eclosión 79.50 % a una solución de  $10^9$  y por último una eclosión de 78.62 % a una solución de  $10^9$ .

### Dosis infectiva en sustrato estéril

Figura 7

Dosis infectiva ideal en sustrato estéril y no estéril



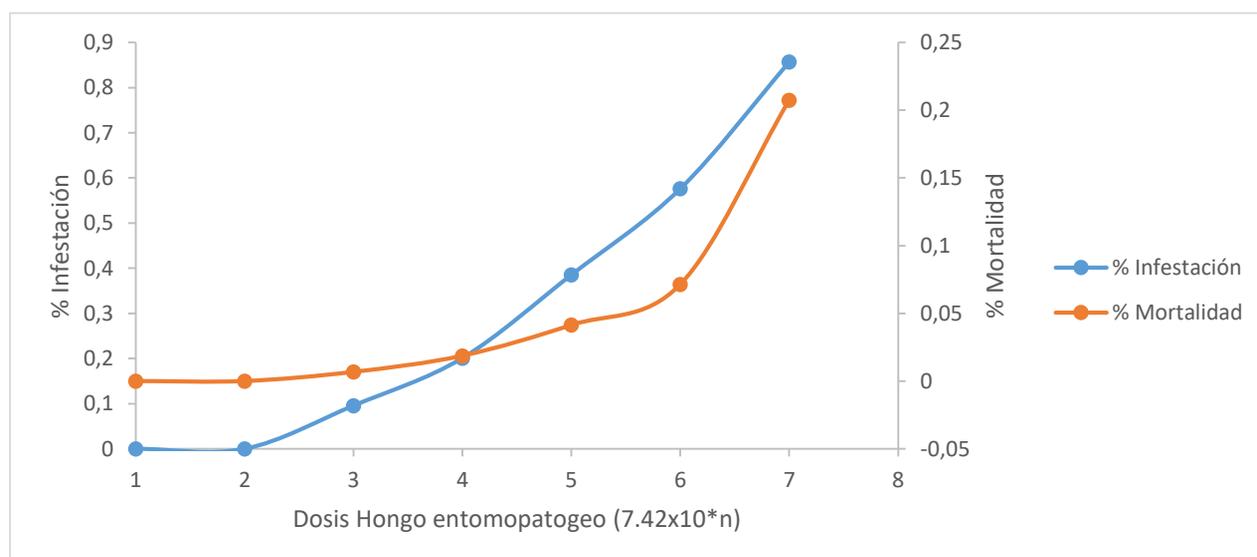
En la tabla 8 se presenta los resultados de infestación del hongo entomopatógeno sobre huevos de garrapata *R. microplus* en sustrato no estéril tratados con las concentraciones:  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  conidias/mL del hongo entomopatógeno. Con relación a la eficacia de infestación, se determinó diferencias estadísticas entre la concentración  $1 \times 10^7$  respecto al resto de concentraciones con un promedio de 6.71 de huevos infestados por el hongo entomopatógeno de esta manera se determinó que es la dosis infectiva ideal en suelo no estéril. Kaaya et al., (1996) explica en su estudio que *Beauveria Bassiana* y *Metarhizium anisoplae* indujeron una mortalidad en adultos, la fecundidad y la eclosión de los huevos en *Rhipicephalus*

*appendiculatus*. Se debe tener en cuenta que en estos tratamientos el hongo entomopatógeno esta propenso a la actividad de otros organismos que se encuentran en el suelo debido que en estos tratamientos no se esterilizo el suelo. En su estudio Vega (2018), menciona que hongos endófitos pueden afectar el establecimiento de otro hongo como *Beuveria bassiana*, además estos pueden influir en su establecimiento y aspectos que estén asociados con el hongo como la especie, cepa, concentración de inóculo.

### Factor de correlación para Dosis letal de *Beuveria spp* en suelo estéril

#### Figura 8

Determinación dosis letal respecto al porcentaje de infestación y mortalidad en suelo estéril



Se aplicó un factor de correlación aplicado en farmacología en la figura 8 que permite el cálculo de dosis con pocas muestras permitiendo proyectar una distribución sigmoidea de los datos para su interpretación. Los datos no alcanzaron una mortandad del 50% de los huevos, por lo cual *Beuveria spp* no tiene DL50 de control ovicida, por lo que no se aplica Probit. Del total de huevos inoculados en todos los tratamientos y sus repeticiones, se determinó que el control máximo alcanzado fue de un 20 % de

huevos (DL20), con la dosis máxima de concentración de esporas que fue de  $7.42 \times 10^7$ . El factor de corrección empleado en los datos para mostrar una distribución sigmoidea permite mostrar de manera armónica del aumento de mortandad que se observa conforme aumenta la dosis (concentración de conidias), teniendo una mortalidad de huevos de 0.6 % a una dosis  $7.42 \times 10^3$ , una mortalidad de 1.8 % a una dosis de  $7.42 \times 10^4$ , una mortalidad de 4% a una dosis  $7.42 \times 10^5$ , una mortalidad de 7% a una dosis  $7.42 \times 10^6$  y obteniendo el 20 % de mortalidad con una dosis de  $7.42 \times 10^7$ .

Valvuen y Alzate (2007) mencionan en un estudio sobre la efectividad de *Beauveria spp* en larvas de garrapata, determinando la DL50 que fue de  $1.36 \times 10^3$  conidias/ml y una DL90 de  $9.94 \times 10^8$  conidias/ml, demostrándose una buena eficacia sin utilizar concentraciones más altas.

De igual manera se identificó que la infestación de los huevos por parte del hongo entomopatógeno es mayor mientras aumenta la dosis de la solución, describiendo una infestación de un 9% a una dosis de  $7.42 \times 10^3$ , una infestación de 20% a una dosis de  $7.42 \times 10^4$ , una infestación de 38% a una dosis  $7.42 \times 10^5$ , una infestación de 57% a una dosis  $7.42 \times 10^6$ , y obteniendo el 85% de infestación con una dosis de  $7.42 \times 10^4$ . Herrera y Romero (2022) menciona en su estudio que la DL50 de *Beauveria spp* es de  $1.18 \times 10^3$  esporas/ml.

Gindin et al., (2009), mencionaron que la eficacia ovicida de dos hongos hifomicetos entomopatógenos: *Metarhizium anisopliae* variedad *acridum* y *anisoplae*, redujeron los porcentajes de eclosión de los huevos de tres especies de garrapatas al 0-32% en comparación con el 80-90% en los huevos del control. Determinando que son muy virulentos para huevos de garrapata, reduciendo los porcentajes de eclosión al 2-6%.

**Tabla 9.**

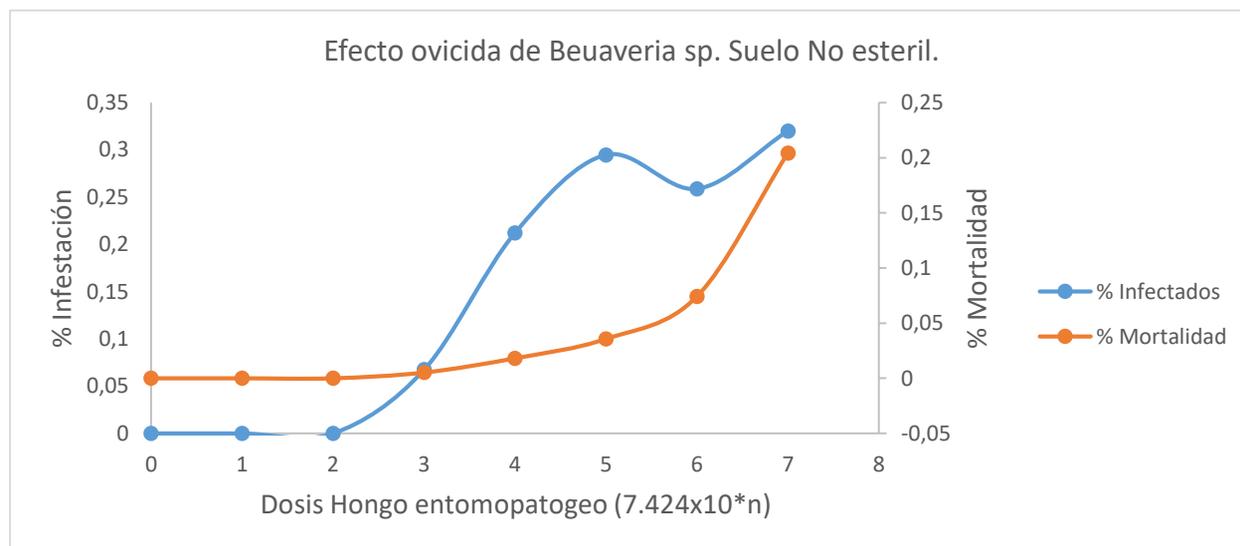
Infestación y mortalidad de huevos de garrapata *R. microplus* por el efecto de *B. bassiana* a diferentes concentraciones.

Concentración	Infestación (%)	Mortalidad (%)
Testigo	0	0
$\times 10^3$	9	0.6
$\times 10^4$	20	1.8
$\times 10^5$	38	4.1
$\times 10^6$	57	7.1
$\times 10^7$	85	20

#### Factor de correlación de la Dosis letal en suelo no estéril

**Figura 9.**

Determinación dosis letal respecto a porcentaje de infestación y mortalidad en no suelo estéril



Comparando la figura 9, las sigmoides del suelo no estéril podemos observar que la distribución de la mortalidad es prácticamente la misma, lo cual nos permite

observar que no existe un bloque de la actividad de *Beauveria sp* por parte de los organismos presentes en la distribución sigmoide.

Comparando las curvas sigmoides de infestación observamos que en el suelo no estéril existe una mayor cobertura de hifas sobre los coriones de los huevos, estas hifas pueden corresponder a la presencia de otros hongos saprofitos presentes en el suelo los cuales crecen sobre el corion del huevo, pero no inhiben la germinación del mismo.

Nunez et al., (2019) en su estudio de investigación determinaron que existe una reducción significativa con las cepas de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, logrando reducir significativamente los índices reproductivos. Demostrando que *Metarhizium anisopliae* disminuye la eclosión de los huevos en un 21.78% y *Beauveria bassiana* en un 23.37% estos datos no presentaron diferencias significativas.

**Tabla 10.**

Infestación y mortalidad de huevos de garrapata *R. microplus* por el efecto de *B. bassiana* a diferentes concentraciones.

Concentración	Infestación (%)	Mortalidad (%)
Testigo	0	0
x10 <sup>3</sup>	6	0.5
x10 <sup>4</sup>	21	1.8
x10 <sup>5</sup>	29	3.5
x10 <sup>6</sup>	25	7.1
x10 <sup>7</sup>	32	20

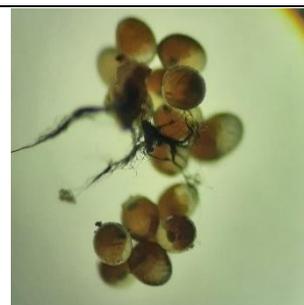
**Figura 10.**

Observación de estructuras de *Beauveria bassiana* para determinar la dosis letal en sustrato estéril no estéril.

---

**Dosis letal/ suelo estéril y no estéril**


---

x10<sup>3</sup>x10<sup>4</sup>x10<sup>5</sup>x10<sup>6</sup>x10<sup>7</sup>
**Número de huevos infestados y concentración de conidias en el suelo**
**Tabla 11.**

Relación de huevos infectados y concentración de conidias en el suelo

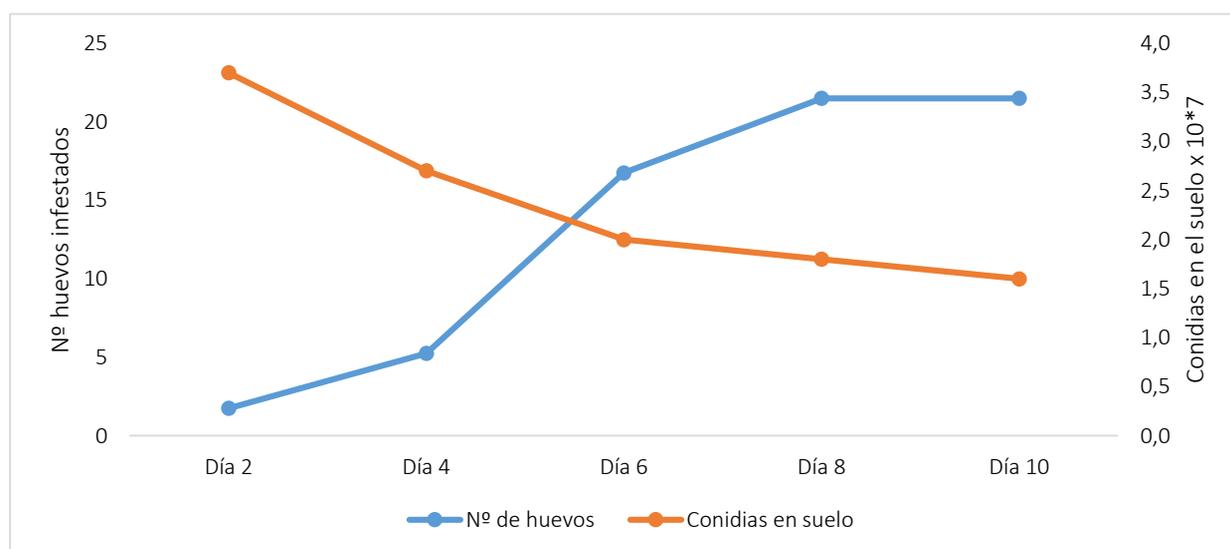
<b>Tiempo</b>	<b><math>\bar{x}</math> huevos infestados</b>	<b>D.E.</b>	<b><math>\bar{x}</math> conidias en suelo</b>	<b>D.E.</b>
Día 2	2 c	±1,7	3,7 ab	±1,2
Día 4	5 bc	±1,3	2,7 ab	±2,4
Día 6	17 ab	±8,9	2,0 b	±1,3
Día 8	22 a	±5,5	1,8 b	±2,9
Día 10	22 a	±5,5	1,6 b	±0,08

Nota: Medias con una letra común en la misma columna no son significativamente diferente, Tukey ( $p$ -Valor < 0,001).

En la tabla 11, se presenta el promedio entre huevos infectados y el número de conidias presentes en el suelo con respecto al tiempo. Se determinó que el promedio de huevos infestados haciende mientras transcurren los días, esto se asimila que mientras más maduro está el huevo de la garrapata es más propenso a infestarse con el hongo entomopatógeno. Rivera et al., (2021) en su evaluación de la micosis de *Metarhizium anisoplae* sobre huevos de *R. annulatus* ultimaron que los huevos más jóvenes son menos susceptibles a infecciones por los hongos entomopatógenos de la especie *Metarhizium anisoplae* a concentraciones de  $2.5 \times 10^5$  y  $2.5 \times 10^6$  conidias/cm<sup>2</sup>. La micosis de los huevos de mayor edad alcanzó un 98 a 100%, mientras que huevos más jóvenes fue de 23 a 35%. Otro estudio realizado por Gindin et al., (2009), también da a conocer que huevos de garrapata más viejos tenían mayor susceptibilidad a la infección por hongos entomopatógenos comparado a los huevos juvenes.

### Figura 11.

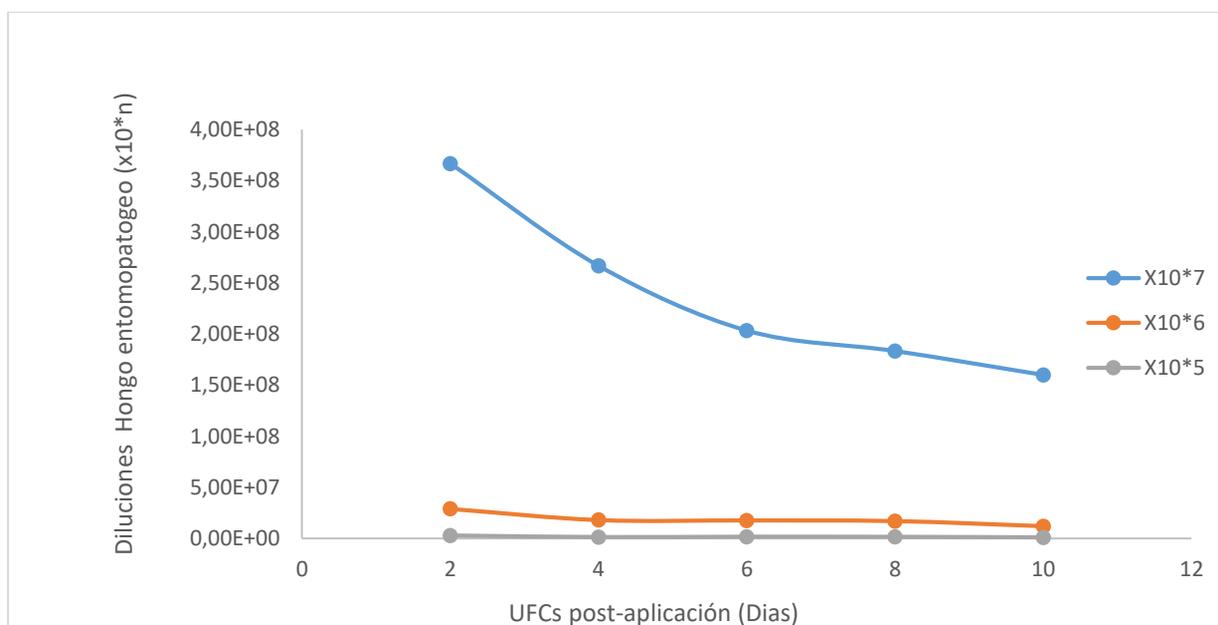
Tiempo letal (50) en relación de numero huevos infectados y conidias presentes en el suelo



Según lo observado en la figura 11, el número de huevos infestados incrementa desde el día 6 pero se evidencia una mayor infestación entre los días 8 y 10 posterior a la aplicación de la solución. Estos resultados tienen similitud con los reportados por (Rivera, y otros, 2021) que hongos entomopatógenos *Metarhizium anisoplae* y *Cordyceps bassiana* a concentraciones de  $1 \times 10^7$  conidias/mL causan efectos perjudiciales a los huevos de garrapata *R. microplus* de tres, ocho y diecisiete días de edad.

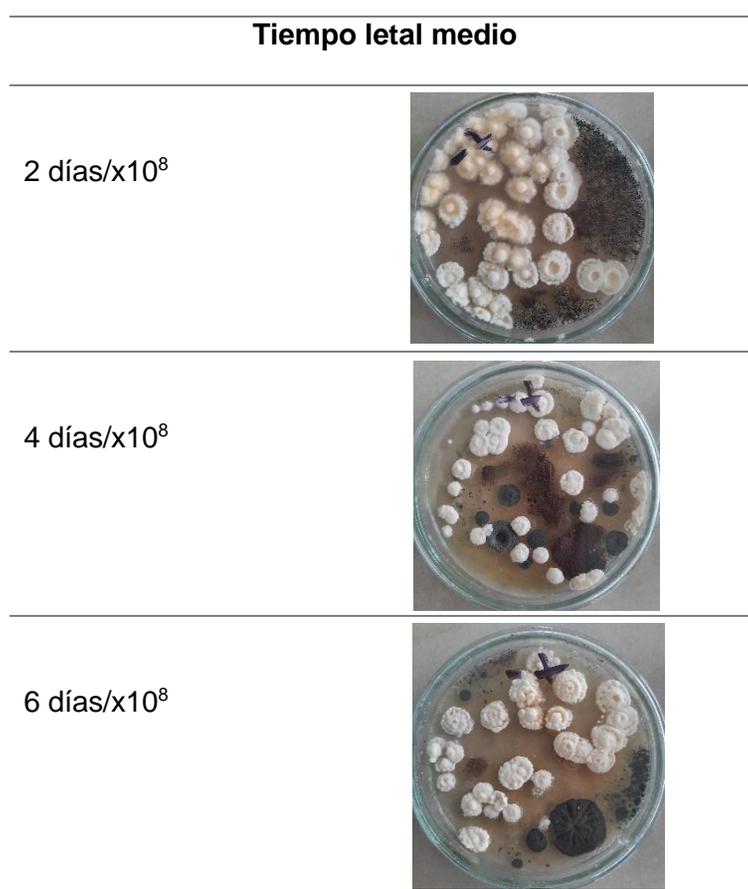
### Figura 12.

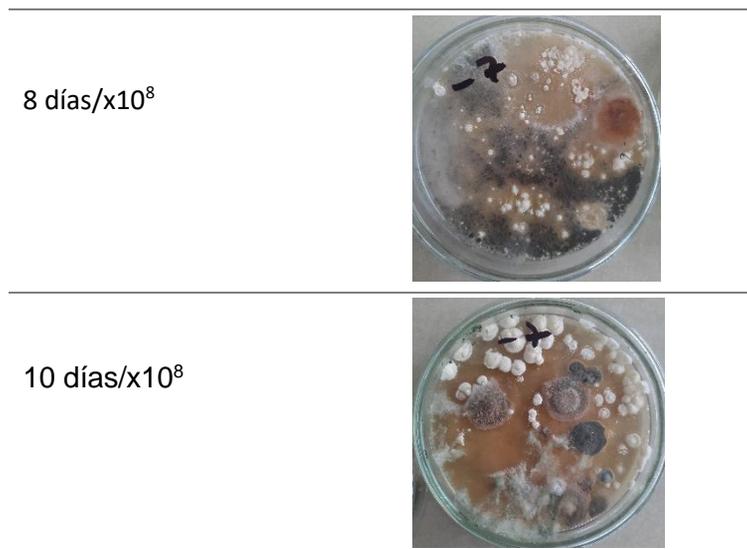
Tiempo letal (TL) concentración de conidias en el suelo.



La toma de datos se realizó durante 10 días, cada 2 días se tomó muestras de 4 gr del sustrato, se empleó como dosis máxima  $7.42 \times 10^7$ , sin embargo, se observó que al realizar la prueba de Unidad Formadoras de Colonias (UFCs) del sustrato su concentración alcanzó  $4.0 \times 10^8$ , este incremento se da debido a que al permearse el agua en el sustrato las conidias se quedaron en la superficie del suelo ocasionando el incremento de concentración en un exponencial.

Partiendo de la concentración máxima en un lapso de 10 días cae la concentración de conidias  $3.50 \times 10^8$  a  $1.50 \times 10^8$ , de esta manera se observa que la disminución de conidias vivas en el suelo es paulatina, asimismo la concentración  $\times 10^7$  se mantendrá al menos por un mes, lo que permitiría con una sola aplicación el control de huevos en un (20%), y con esta concentración se tiene la capacidad de controlar neo larvas, larvas y adultos que se encuentran en el suelo, como lo sustentan Pozo et al., (2018); Briones et al., (2021) y Tofiño et al., (2018), que la mortalidad de neo larvas de garrapata supera el 90% a partir de las concentraciones de  $\times 10^7$  conidias/mL.

**Figura 13.**Determinación UFCs de *Beauveria bassiana* en el sustrato



## Capítulo VI

### Conclusiones

La cepa de *Beauveria bassiana* que posee la Estación Experimental Santo Domingo INIAP, ha demostrado que el máximo control que tiene sobre huevos de garrapata *Rhipicephalus microplus*, fue de un 20% empleándose a una concentración  $7,424 \times 10^7$ .

A diferencia del suelo estéril, se observó que los huevos puestos en el suelo sin esterilizar presentaban un mayor porcentaje de crecimiento de hifas de hongos sobre el corion, pero estos hongos al ser saprofitos no incrementaron el porcentaje de mortandad de las ninfas de garrapata.

Los huevos de garrapata *Rhipicephalus microplus* tienden a tener una mayor contaminación desde el día 6, 8 y 10, con esto se evidencia que mientras más joven es el huevo menor es el porcentaje de micosis respecto a los huevos maduros que alcanzaron un mayor porcentaje de micosis. Esto se difiere a que los huevos tienen una

estructura de defensa a base de lípidos que impide que el hongo penetre y germine y no forme el apresorio.

Si se realiza una fumigación a capacidad de campo la concentración de conidias aumente un exponencial manteniendo la dosis máxima por el lapso de un mes. Por lo que se estima que esta concentración máxima se mantendrá durante un mes debido a la cubierta de much que le provee a la conidia de humedad, oscuridad y temperatura ambiental fresca.

Si el suelo se hubiera encontrado saturado se asume que las conidias serían lavadas por la escorrentía, mientras que, si el suelo se encuentra seco, se asume que la permeabilidad arrastraría a las conidias a sustratos inferiores, por lo cual el control de huevos de garrapatas y ninfas sería menor.

Se acepta la hipótesis nula, la cepa del hongo entomopatógeno INIAP EESD *Beauveria bassiana* no se considera un ovicida debido a que no presenta una Dosis Letal Media (DL50), sin embargo se considera un controlador de un estado biológico (huevo) del ectoparásito ya que alcanza la Dosis Letal 20 (DL20).

Dentro de la actividad de supervivencia de las conidias de *Beauveria bassiana* en el sustrato estas pueden sobrevivir más de 20 días, donde se termina el estado biológico del huevo y comienza el estado larva y ninfa, donde el hongo entomopatógeno tiene un gran porcentaje de efectividad en el control.

### **Recomendaciones**

Se recomienda realizar ensayos con la concentración de  $\times 10^7$  del hongo entomopatógeno *Beuaveria bassiana* en las diferentes edades de los huevos de garrapata, debido a que las hembras adultas teologinas no ovipositan todos huevos al mismo tiempo.

Se sugiere la adición de sustancias causticas que ayuden a romper la secreción glandular protectora que poseen los huevos de garrapata lo que permite que el hongo entomopatógeno lo infecte, como es la tierra de diatomea.

Para aplicación en campo del hongo entomopatógeno se debe tomar en cuenta los factores ambientales, debido a que si se presentan altas precipitaciones el hongo se lavara por escorrentías, es recomendable la aplicación entre salida de invierno y entrada de verano, donde los suelos se encuentran a capacidad de campo y no se presentara perdidas de conidias en el suelo.

En la aplicación en el campo se debe tener en cuenta el corte del pasto ya que esto otorgara el alargamiento de vida de las conidias y su viabilidad en el suelo, permitiendo controlar otros estados biológicos del ectoparásito.

### Bibliografía

Agrocalidad. (02 de 06 de 2022). *RESOLUCIÓN 0105 EL DIRECTOR EJECUTIVO DE LA AGENCIA DE REGULACION Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO.*

<https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2022/06/DAJ-202225A-0201.0105.pdf>

Agronet. (21 de 01 de 2022). *Conozca el hongo que puede reducir las garrapatas en bovinos hasta en un 99%.* <https://agronet.gov.co/Noticias/Paginas/Conozca-el-hongo-que-puede-reducir-las-garrapatas-en-bovinos-hasta-en-un-99.aspx>

Alonso, M., & Salas, A. (2021). Entomopathogenic Fungi for Tick Control in Cattle Livestock From Mexico. *Front. Fungal Biol.* .

Álvares, R. (04 de 2017). *REVIEW ON THE BIOLOGY OF Rhipicephalus sanguineus (ARTHROPODA, CHELICERATA)(LATREILLE, 1806).*

[https://www.researchgate.net/publication/321093901\\_Revision\\_sobre\\_la\\_biologia\\_de\\_Rhipicephalus\\_sanguineus\\_Arthropoda\\_ChelicerataLatreille\\_1806](https://www.researchgate.net/publication/321093901_Revision_sobre_la_biologia_de_Rhipicephalus_sanguineus_Arthropoda_ChelicerataLatreille_1806)

Aparecida, E., Alves, D., Berceles, A., & Monterio, A. (2006). Influência de meios de cultura em teste de viabilidade de fungos entomopatogênicos. *Universidade Estadual Paulista (Unesp)*, 36(4), 14844-900. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000400043>

Arguedas, M., Alvarez, V., & Bonilla, R. (2008). Eficacia del hongo entomopatógeno *Metharrizium anisopliae* en el control de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Agronomía Costarricense*, 137-147.

Báez, F., Perdomo, C., Pincay, A., Tello, C., Villamizar, L., Jackson, T., . . . Viera, W. (2019). Manual para el analisis de calidad de formulaciones de hongos beneficios. . *Manual N.-112. INIAP- Experimental Santa Catalina.* , 45.

Baioumy, A., Swelim, H., Ahmed, A., Fatma, M., Marzouk, A., & Sherif, H. (2021). RETRACTED ARTICLE: Acaricidal and pathogenic effects of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on engorged females of the fowl tick, *Argas persicus* (Argasidae). *Experimental and Applied Acarology*, 331–354.

Benavides, E., Romero, J., & Villamil, L. (2016). *Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático*. Guía para el manejo de garrapatas y adaptación al cambio climático: <http://repiica.iica.int/docs/B4212e/B4212e.pdf>

Bermeo, D. (25 de 06 de 2022). *Determinacion de la actividad entopatgena del hongo Beauveria bassiana. Sobre el gusano blanco de la papa (Premnotrypes vorax H)*. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/22954/1/UPS-CT009997.pdf>

Bouattour, A., Camicas, J., Caminante, A. E., Guglielmone, A., Horak, Y., Jongejan, F., . . . Pegram, R. (2006). La distribución conocida y las preferencias ecológicas del subgénero

- de garrapatas *Boophilus* (Acari: Ixodidae) en África y América Latina. *Experimental & Applied Acarology*, 38(2-3), 219-235. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-0003-5>
- Bravo, B., & Carranza, K. (2 de 06 de 2022). *SO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS COMO ALTERNATIVA EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE GARRAPATAS EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS*.  
<https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5846>
- Briones, D., Juan, P., Manuel, M., & Murga, V. (2021). Efecto del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en el control de garrapatos en ganado bovino. *Rev Inv Vet*, 35 (5).
- Bustillo, A., & Patricia, M. (2002). ¿Cómo reactivar la virulencia de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café? *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 63.  
<https://doi.org/https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/6951/A2056e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cervantes, Á., Mancilla, G., González, P., Sandoval, C., & Torres, F. (2007). Bioensayos in vitro de relevancia en las ciencias biológicas y agropecuarias. *Bioagrobiencias*, 431.
- Cheng, P., Gong, M., Li, W., Peng, H., & Wang, H. (2021). The Toxins of *Beauveria bassiana* and the Strategies to Improve Their Virulence to Insects. *Frontiers in Microbiology*, 12, 705343. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705343>
- Coleman, P., Perry, B., & Woolhouse, M. (2001). Endemic stability--a veterinary idea applied to human public health. *The Lancet*, 1284-6.
- Contero, R., & Felicita, O. (2006). UTILIZACIÓN DE BIOENSAYOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINACIÓN EN AGUA DE RIEGO EN LA CUENCA DEL RÍO GRANOBLES. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 38-42.
- Correa, F. (2006). MANUAL DE LABORATORIO DE BIOENSAYOS. *ResearchGate* .

Costa, C., & Ide, S. (2006). *Insectos inmaduros metamorfosis e identificación*. [http://sea-entomologia.org/PDF/M3M5/019\\_028\\_II\\_Estados.pdf](http://sea-entomologia.org/PDF/M3M5/019_028_II_Estados.pdf)

Del Pozo, E., Garcia, I., & Yanira, H. (07 de 2018). *Efectividad de aislados de Beauveria bassiana "sensu lato" sobre Rhipicephalus microplus*. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-57852018000300005](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852018000300005)

Delgado, P. (2016). *EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE UN INSECTICIDA BIOLÓGICO MEDIANTE ANÁLISIS PROBIT*. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/[http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_agronomia/Zoologia\\_Agricola/Manejo\\_Integrado/Competencia3/Metodos\\_para\\_realizar\\_Analisis\\_Probit\\_-\\_GU%C3%8DA.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Zoologia_Agricola/Manejo_Integrado/Competencia3/Metodos_para_realizar_Analisis_Probit_-_GU%C3%8DA.pdf)

Diaz, A., I, R., H, F., & R, R. (2006). *Resistencia de la garrapata Boophilus microplus a los ixodicidas*. [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X2006000200003](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2006000200003)

Diaz, M., & Agustin, S. (2022). *Rhipicephalus microplus: biología, control y resistencia*. Centro de enseñanza, investigación y extensión en ganadería tropical.: [https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/centros/ceiegt/archivos/Manual\\_R\\_Microplus.pdf](https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/centros/ceiegt/archivos/Manual_R_Microplus.pdf)

Diaz, S. (06 de 05 de 2015). *"IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE GARRAPATAS EN GANADO BOVINO*. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/18362/1/Tesis%2033%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20354.pdf>

Donoso, N. (06 de 2020). *Soluciones químicas*. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://colegiosaintmaurices.cl/wp-content/uploads/2020/06/2M-Qu%C3%ADmica-Gu%C3%ADa-10.pdf>

Eliopoulos, P., Kitsiou, F., Mantzoukas, S., & Natsiopoulos, D. (2022). Entomopathogenic Fungi: Interactions and Applications. *Encyclopedia*, 2(2), 646-656.

<https://doi.org/10.3390/encyclopedia2020044>

Fernandes, É. K., & Vânia R.E.P. Bittencourt: Donald W. Roberts. (2012). Perspectivas sobre el potencial de los hongos entomopatógenos en el control biológico de las garrapatas.

*Experimental Parasitology*, 300-305.

Fernandes, E., Drauzio, A., Bahiense, T., Donald, M., & Vania, R. (2011). Una búsqueda intensiva de agentes prometedores de control biológico fúngico de las garrapatas, particularmente *Rhipicephalus microplus*. *Parasitología Veterinaria*, 307-318.

Fernández, J. (10 de 2020). *Evaluación de la actividad biopesticida del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana sobre la broca del café (Hypothenemus hampei)*.

<http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/19620>

Flores, J. (06 de 2015). *CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SECUENCIAS ESTs CODIFICANTES DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA CON POTENCIAL INMUNOPROTECTOR EN LA GARRAPATA DEL GANADO BOVINO Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

<https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/101/1/Jos%C3%A9%20Miguel%20Flores%20Fern%C3%A1ndez.pdf>

Frutos, J. (2015). *EFEECTO DE LA UTILIZACIÓN DEL MULCH NATURAL, MAÍZ (Zea mays L.), CAÑA DE AZÚCAR (Saccharum officinarum L.), VICIA (Vicia sativa L.), Y AVENA (Avena sativa L.) SOBRE LA PRODUCCIÓN DEL BRÓCOLI (Brassica oleracea L.) EN EL CAMPUS QUEROCHACA*.

[https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/18279/1/Tesis-](https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/18279/1/Tesis-109%20%20%20Ingenier%C3%ADa%20Agron%C3%B3mica%20-CD%20353.pdf)

[109%20%20%20Ingenier%C3%ADa%20Agron%C3%B3mica%20-CD%20353.pdf](https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/18279/1/Tesis-109%20%20%20Ingenier%C3%ADa%20Agron%C3%B3mica%20-CD%20353.pdf)

- Gallardo, J., & Morales, J. (1999). Boophilus microplus (Acari; Ixodidae: PREOVIPOSICION, OVOPOSICION, INCUBACION DE LOS HUEVOS Y GEOTROPISMO. *Bioagro*, 77-87.
- Garza, E. (2007). La garrapata Boophilus microplus y su manejo en la planicie huasteca. *Instituto nacional de investigaciones forestales, agricolas y pecuarias*, 2-3.
- Gindin, G., Ment, D., Rot, A., Glazer, I., & Samish, M. (2009). Pathogenicity of Metarhizium anisopliae (Hypocreales: Clavicipitaceae) to Tick Eggs and the Effect of Egg Cuticular Lipids on Conidia Development. *J. of Medical Entomology*, 531-538.
- Gomes, G. (2023). *Oleos essenciais utilizados para controle de Rhipicephalus microplus no Brasil*. Sao Paulo: Dialectica.
- Guan, G., Han, X., Li, Y., Luo, J., Ma, C., Ren, Q., . . . Yin, H. (2013). Effectiveness of Beauveria bassiana sensu lato strains for biological control against Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) in China. *Parasitology International*, 62(5), 412-415. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.04.008>
- Herrera, L., & Romero, A. (2022). "Control de ninfas de garrapatas (Rhipicephalus microplus) en combinación de Beauveria spp. con moléculas orgánicas y químicas". [Tesis Ingeniería, Universidad ESPE]. Repositorio Institucional. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/32381>
- Hidalgo, M., Vargas, O., & Vite, H. (2020). Análisis situacional de la actividad ganadera en la parroquia Palmales del cantón Arenillas. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 124-130.
- Holder, D., & Keyhami, N. (2005). Adhesion of the entomopathogenic fungus Beauveria (Cordyceps) bassiana to substrata. *Appl Environ Microbiol*, 71(9).

- Hoog, G. (1972). The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Studies in Mycology*, 41.
- Iza, K. (2018). *Conversión alimenticia en cuyes bayos y blancos en la etapa de crecimiento en la cuarta progenie de cruce genético de tipo absorbente*. Universidad Técnica de Cotopaxi. <https://doi.org/http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/5218/6/PC-000270.pdf>
- Jimenez, M. d., & De la Cruz, B. (2017). Tratamiento de la garrapata en Atención Primaria. *Med fam Andal*, 74-79.
- Kaaya, G., Mwangi, E., & Ouna, E. (1996). Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol*, 15-20.
- Keswani, C., Ray, S., Sarma, B., Singh, H., Singh, S., Singh, S., & Yadav, S. (2015). *Beauveria bassiana*: Biocontrol Beyond Lepidopteran Pests. *Biocontrol of Lepidopteran Pests*, 43, 219-235. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-14499-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-14499-3_10)
- Llòria, M. (05 de 2002). *Garrapatas.Parásitos animales*. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-garrapatas-parasitos-animales-13031767>
- Llòria, M. (2002). *Garrapatas.Parásitos animales*. *Farmacia Profesional*, 73-77.
- Lorenzo, P., & María, P. (1999). GENERALIDADES SOBRE LAS GARRAPATAS. En N. Tomás, *MANEJO INTEGRADO DE GARRAPATAS EN BOVINOS* (págs. 8-31). Tolima: CORPOICA, Regional 6.
- Mahoney, D., & Ross, D. (1972). Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust Vet J*, 1751-0813.

- Marquez, D. (2003). Nuevas Tendencias para el Control de los Parasitos de Bovinos en Colombia. En D. Marquez, *Nuevas Tendencias para el Control de los Parasitos de Bovinos en Colombia* (págs. 89-90). Colombia: Corpoica.
- Meiling, N., & Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, 145-155.
- Moncada, A., Villar, D., Angulo, J., Chaparro, J., & Mahecha, L. (2015). Aproximación al uso de hongos entomopatógenos y vacunas para el control sostenible de garrapatas en sistemas ganaderos: revisión. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 55-72.
- Morocho, D. (2019). *Evaluación in vivo de Metarhizium anisopliae (Metchnikoff) y Beauveria bassiana (Balls) sobre garrapatas (Acari: Ixodidae) que parasitan el ganado vacuno, en El Chaco, Ecuador.*  
<http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/21029/T-IASA%20I-005504.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Motta, P., & Murcia, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 77-90.
- Nunez, P., Barrios, R., Silva, R., & Romero, G. (2019). EVALUACIÓN IN VITRO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN EL CONTROL DE LA GARRAPATA DEL GANADO BOVINO. *AGROBIOLOGÍA*, 283-293. .
- Organización Marítima Internacional. (2006). *Código Internacional de Mercancías Peligrosas.*  
[https://www.quimica.es/enciclopedia/Dosis\\_letal.html](https://www.quimica.es/enciclopedia/Dosis_letal.html)
- Pozo, E., Irma, C., & Yanira, H. (2018). Efectividad de aislados de *Beauveria bassiana* “sensu lato” sobre *Rhipicephalus microplus*. *Centro Agrícola*, 45.

Pulido, A., Salazar, R., Humberto, I., Méndez, L., & Barbosa, A. (2016). *Microscopía y Principales Características Morfológicas de Algunos Ectoparásitos de Interés Veterinario*.  
<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/11449/104>

18

Quiroz, H., Figueroa, J., Ibarra, F., & López, M. (2011). EPIDEMIOLOGÍA DE ENFERMEDADES PARSITARIAS EN ANIMALES DOMESTICOS . En H. Quiroz, J. Figueroa, F. Ibarra, & M. López, *Artrópodos* (págs. 477-560). Mexico: ISBN:978-607-00-4015-3 .

Rivera, R., Sahagun, A., Cruz, A., Lezama, R., Canchola, M., & Jaime, M. (2021). PATOGENICIDAD DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE HUEVOS DE DIFERENTE EDAD DE LA GARRAPATA *Rhipicephalus microplus*. *Library*, 75-80.

Rodríguez, R., Ojeda, M., Ojeda, N., & Dade, M. (2021). *Otobius megnini*: La garrapata espinosa del oído. *Bioagrocencias*, 14.

Ruiz, N., & Blanco, R. (2009). *Grado de resistencia del Rhipicephalus Boophilus microplus productos ixodidas, y su r odidas, y su residualidad en leche en 20 pr esidualidad en leche en 20 predios del edios del sistema doble propósito del piedemonte llanero*.  
[https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1294&context=medicina\\_veterinaria](https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1294&context=medicina_veterinaria)

Secretaría de Gobernación Mexicana. (01 de 06 de 1988). *Plaguicidas clasificación toxicológica*.  
[https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4738135&fecha=01/06/1988#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4738135&fecha=01/06/1988#gsc.tab=0)

Sepulveda, M. (2019). *Control Biológico de Plagas con Hongos Entomopatógenos Biol N IA@*.  
 chrome-  
 extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclclefindmkaj/https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/2

0.500.14001/4929/NR41482.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=%C2%BFQu%C3%A9%20son%20y%20donde%20se,y%20les%20provocan%20la%20muerte.

Tofiño, A., Ortega, M., Pedraza, B., Perdomo, S., & Moya, D. (2018). Efectividad de *Beauveria bassiana* (Baubassil®) sobre la garrapata común del ganado bovino *Rhipicephalus microplus* en el Departamento de la Guajira, Colombia. *Rev. argent. microbiol*, 50.

Valvueda, D., & Alzate, C. (2007). *EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Beauveria bassiana (Bassi) Y Metarhizium anisopliae (Metchnikoff) EN EL CONTROL DE LA GARRAPATA DEL GANADO Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini) (Acari: Ixodidae)*. Repositorio Institucional. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8952/Trabajo%20de%20grado.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Vega, F. (2018). The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control. *Mycologia*, 4-30.

Velasquez, J., Nadya, C., & Restrepo, F. (2014). Compatibilidad del hongo entomopatógeno *Purpureocillium* sp. cepa UdeA0106 con biocontroladores y productos fitosanitarios utilizados en cultivos de crisantemo. *Actualidades Biológicas*, 101.

Vivas, M. (2003). Identificación y Evaluación de Hongos Entomopatógenos en *Perkinsiella Saccharicida* (Kirk) y *Mahanarva Andigena* (Jacobi) en Cana de Azúcar. (n.d.). (n.p.): (n.p.). En M. Vivas, *Identificación y Evaluación de Hongos Entomopatógenos en Perkinsiella Saccharicida (Kirk) y Mahanarva Andigena (Jacobi) en Cana de Azúcar*. (n.d.). (n.p.): (n.p.). (pág. 6). Guayaquil: INIAP.