



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

TEMA

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

AUTOR

Ligña Sangucho Kevin Daniel

TUTOR

Dr. Gelacio Antonio Gómez Mendoza

SANTO DOMINGO DE LOS TSACHILAS, -AGOSTO 2023



01. Introducción

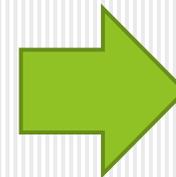
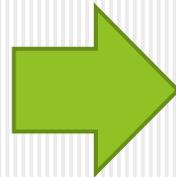
La garrapata uno de los ectoparásitos más importantes del ganado bovino en países tropicales.



La ganadería bovina un pilar fundamental dentro del sector agropecuario del Ecuador.



La resistencia a acaricidas problema que ha generado la búsqueda de alternativas de control biológico.



02.

Objetivos

General	<ul style="list-style-type: none">➤ Determinar la eficiencia del efecto ovicidas de la cepa <i>Beauveria bassiana</i> sobre huevos de garrapata (<i>Rhipicephalus microplus</i>) en invernadero.
Específicos	<ul style="list-style-type: none">➤ Determinar la Dosis Letal Media (DL50) y dosis letal (DL90) de <i>Beauveria</i> spp para el control de huevos de garrapata en sustrato cubierto por mulch estéril.➤ Determinar el tiempo letal medio (TL50) para las conidias de <i>Beauveria</i> spp. partiendo de una concentración de esporas 1×10^7 en sustrato cubierto por mulch estéril.➤ Determinar el tiempo de supervivencia de las conidias de <i>Beauveria</i> spp. en sustrato cubierto por mulch (estéril y sin esterilizar) bajo invernadero.

Hipótesis

Ho (nula)

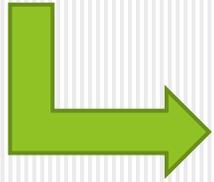
La aplicación de *Beauveria spp.* al sustrato no tiene capacidad ovicida en huevos de garrapata, aunque este sea colocado posterior a su aplicación en el suelo en drench.

Ha (Alternativa)

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.

Generalidades

➤ *Rhipicephalus microplus*



Taxonomía
Reino: Animalia
Phylum: Artropoda
Subphylum: Chilecerata
Clase: Arachnida
Subclase: Acaria
Orden: Parasitiformes
Suborden: Ixodida
Superfamilia: Ixodoidea
Familia: Ixodidae
Genero: Rhipicephalus

Enfermedades



- Babesiosis
- Anaplasmosis
- Piroplasmosis

Efectos



Mortalidad

Retardo crecimiento

Daños piel



Abortos

Efectos reproductivos

Perdida de peso

Descripción Ectoparásito

Estados biológicos

Huevo

Larva

Ninfa

Adulto



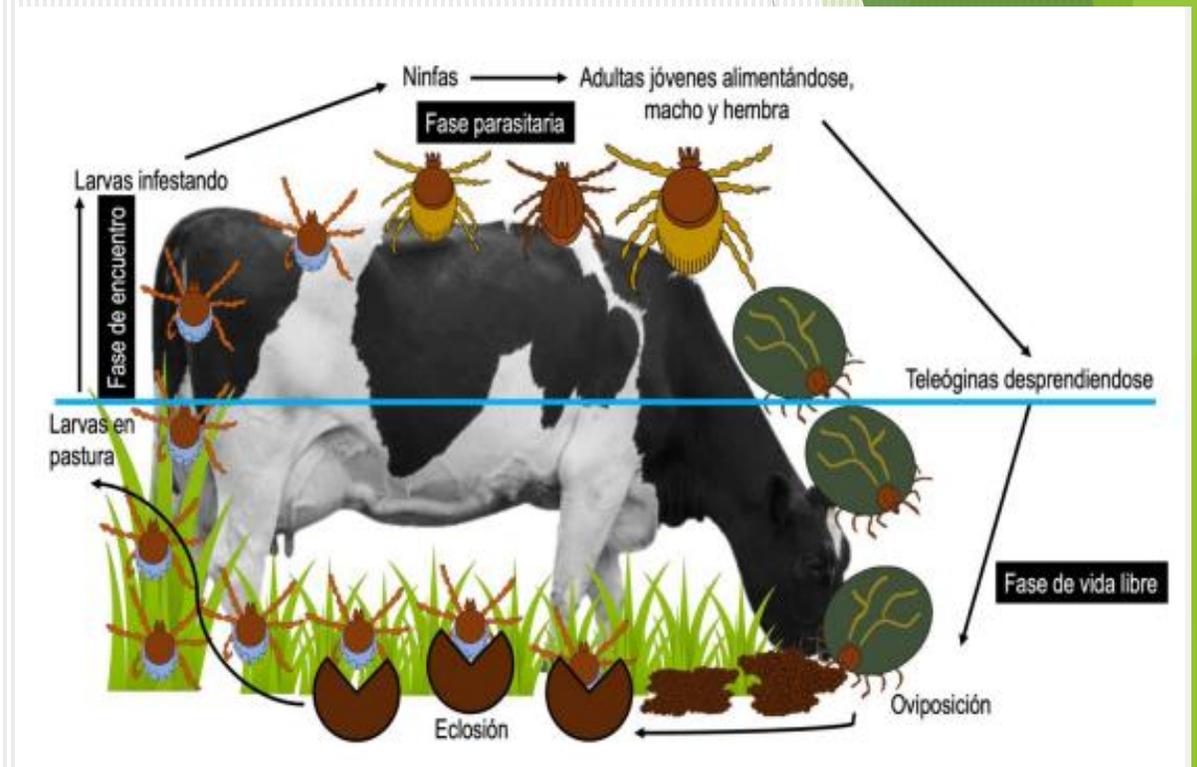
554 μm largo
409 μm ancho
51,76 μg peso

Tres pares de
patas
Diámetro
(0,9mm)

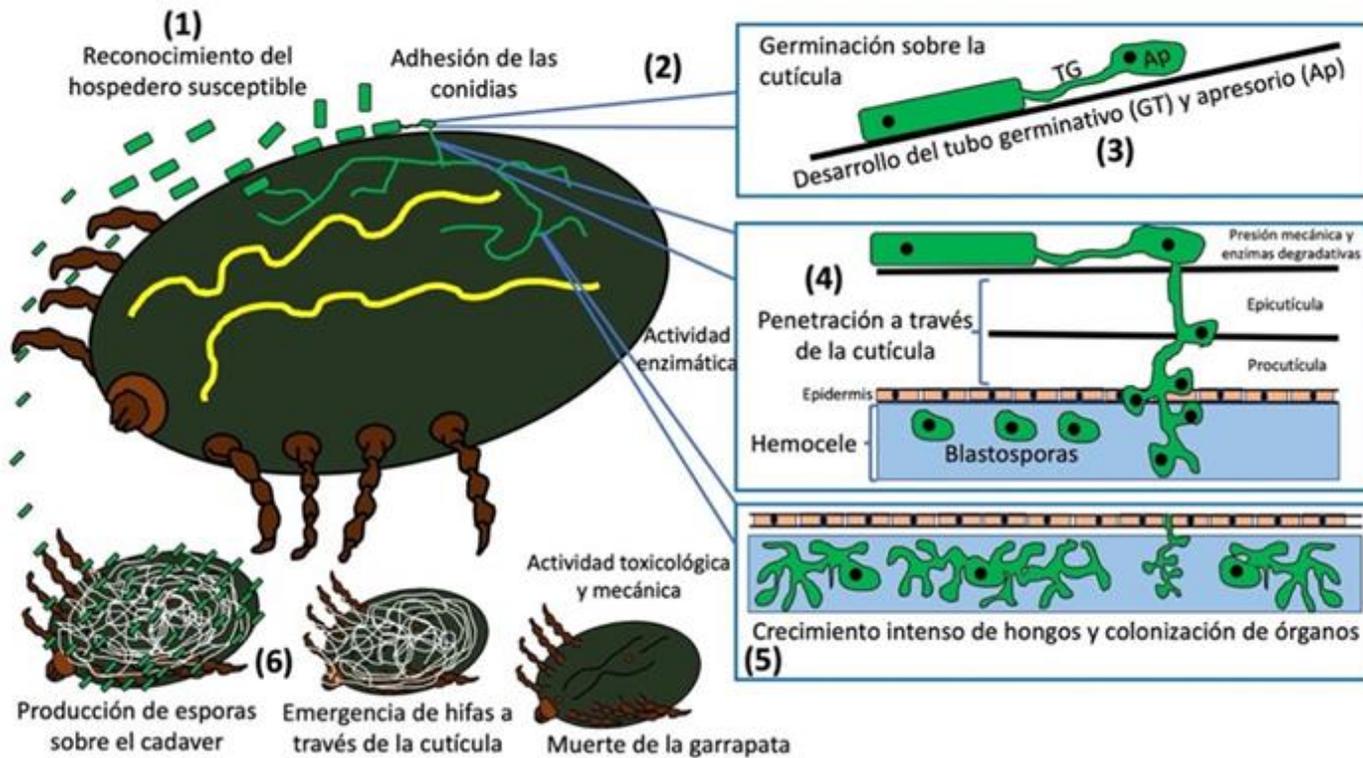
Cuatro pares
de pata

Hembra 10-13
mm
Macho 3-4
mm

Ciclo de vida



Beauveria bassiana



Efectos

Penetración cutícula que se da por acción de hidrolasas (quitinas y lipasas)

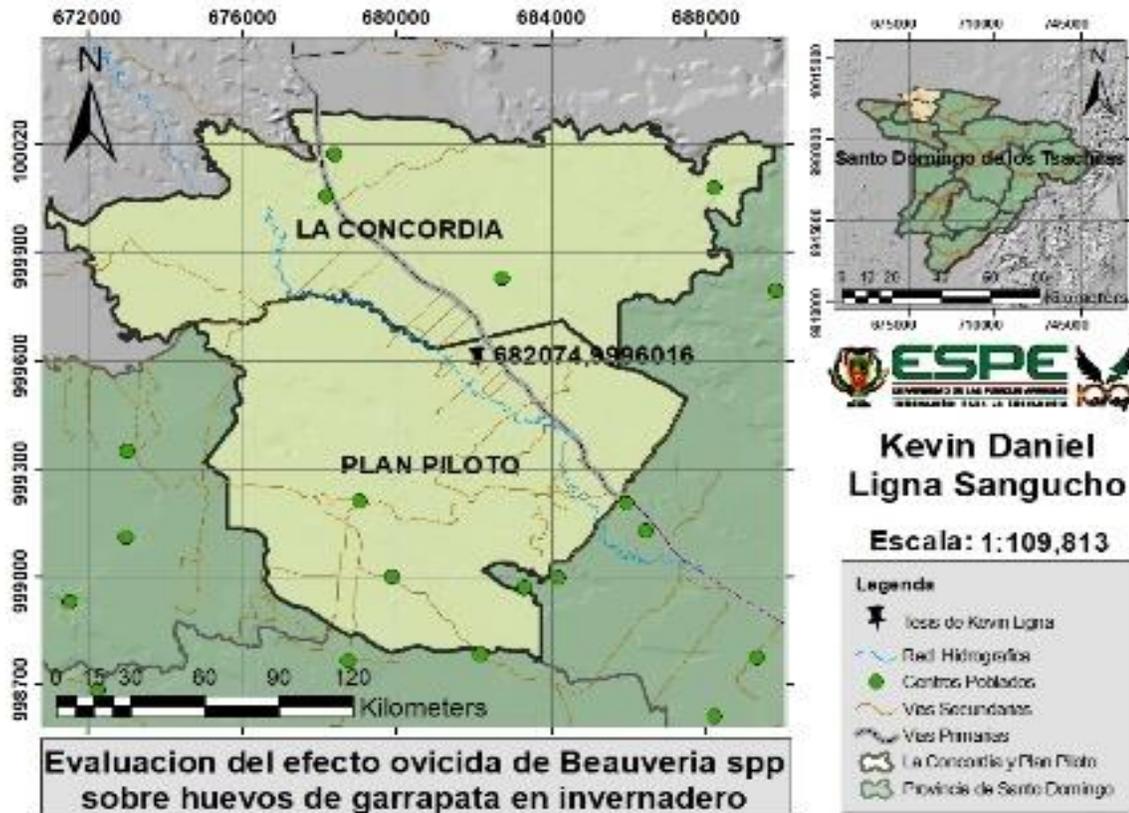
Hongo deuteromiceto
Familia Monilaceae

Hongo cosmopolita afecta mas
700 especies de insectos

Hongo entomopatógeno investiga
por potencial control de garrapatas

03. Materiales y métodos

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.



Materiales en laboratorio

Insumos	Materiales	Equipos
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	

Materiales de invernadero

Insumos	Materiales	Equipos
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	



Tratamientos

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

Tratamiento	Descripción del tratamiento
T1	Beauveria $1 \cdot 10^3$ + Sustrato Estéril
T2	Beauveria $1 \cdot 10^4$ + Sustrato Estéril
T3	Beauveria $1 \cdot 10^5$ + Sustrato Estéril
T4	Beauveria $1 \cdot 10^6$ + Sustrato Estéril
T5	Beauveria $1 \cdot 10^7$ + Sustrato Estéril
T6	Beauveria $1 \cdot 10^3$ + Sustrato
T7	Beauveria $1 \cdot 10^4$ + Sustrato
T8	Beauveria $1 \cdot 10^5$ + Sustrato
T9	Beauveria $1 \cdot 10^6$ + Sustrato
T10	Beauveria $1 \cdot 10^7$ + Sustrato

Tratamientos evaluados para obtener el Tiempo Letal Media (TL 50)

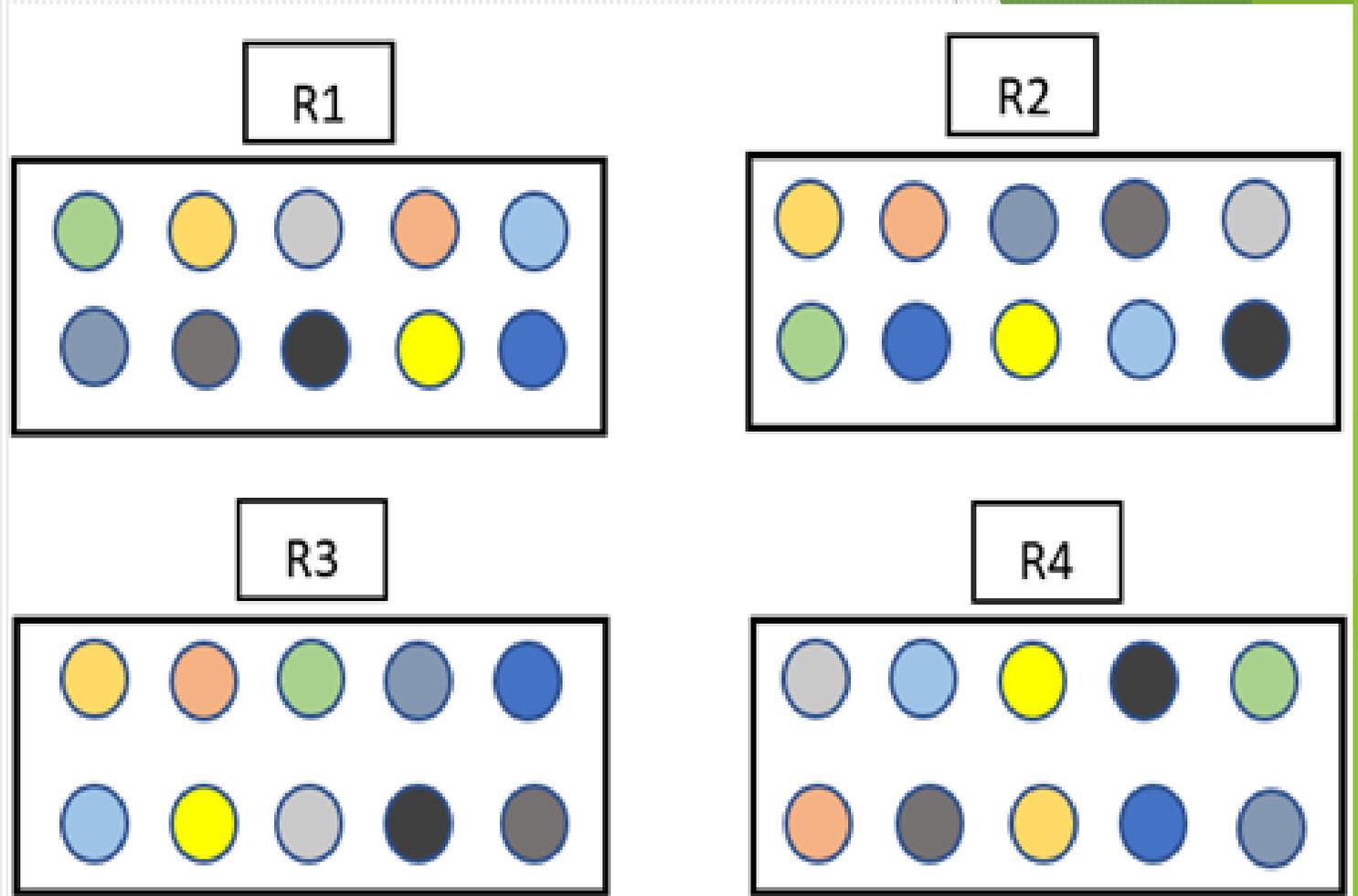
Tratamiento	Descripción del tratamiento
T1	Beauveria $1 \cdot 10^7$ + Huevos depositados en el día 0
T2	Beauveria $1 \cdot 10^7$ + Huevos depositados en el día 2
T3	Beauveria $1 \cdot 10^7$ + Huevos depositados en el día 4
T4	Beauveria $1 \cdot 10^7$ + Huevos depositados en el día 6
T5	Beauveria $1 \cdot 10^7$ + Huevos depositados en el día 8
T6	Beauveria $1 \cdot 10^7$ + Huevos depositados en el día 10
T7	Beauveria $1 \cdot 10^7$ + Huevos depositados en el día 12
T8	Beauveria $1 \cdot 10^7$ + Huevos depositados en el día 14

Análisis estadístico

- Diseño Completamente al Azar (DCA) con cuatro repeticiones
- Prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)
- Regresión Probit

Efecto ovidica

- Dosis Letal media, observación continua cada 5 días hasta el día 20.
- Tiempo Letal medio observación cada 2 días .



Metodología

Recolección de garrapatas



Producción de huevos de garrapata



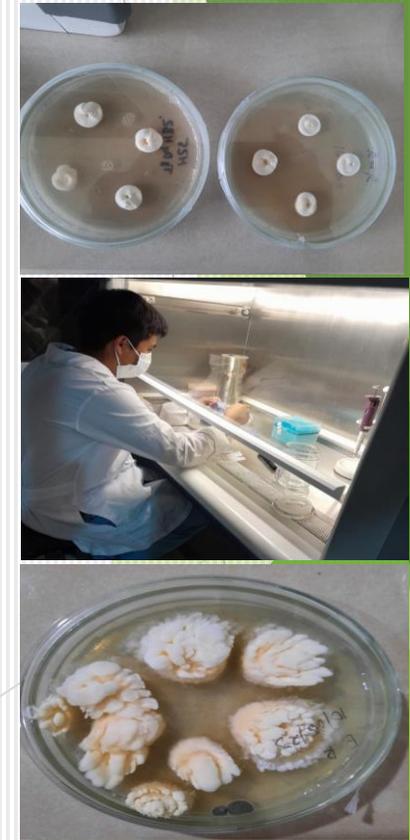
Reactivación del hongo y pruebas preliminares



Repique de huevos contaminados con el hongo entomopatógeno



Repique de cepas de hongos entomopatógenos



Metodología

Preparación
del
invernadero



Preparación
sustrato
(Suelo)



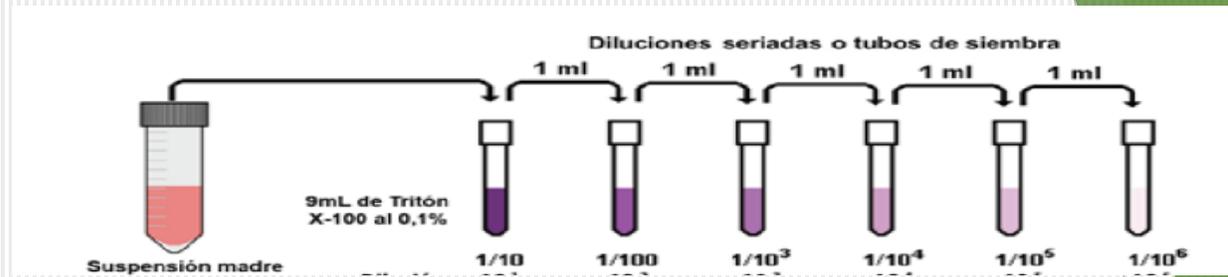
Esterilización
del mulch



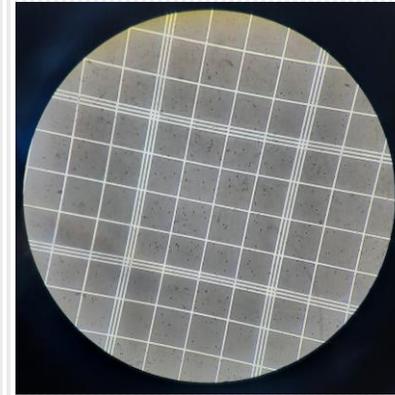
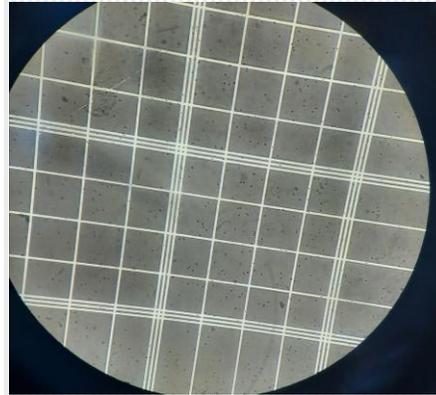
Puesta de
huevos en
campo



Metodología



Determinación de la concentración de esporas mediante conteo de conidias.



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

$$\text{Concentración de conidias} = 24 * 10000 * 16 * 10^2$$

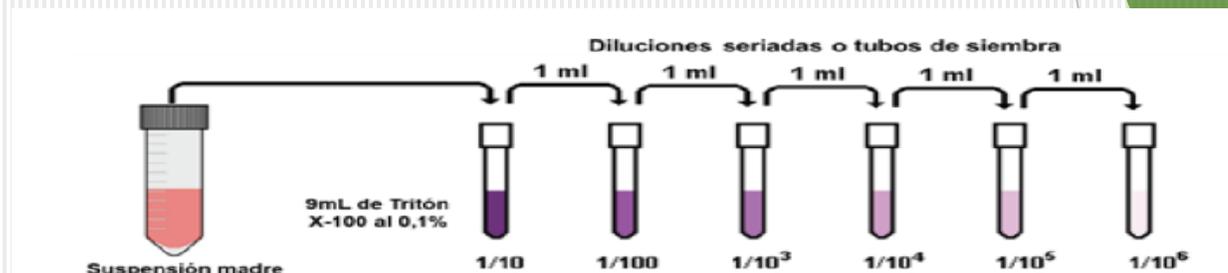
$$\text{Concentración de conidias} = 3,84 \times 10^8$$

Concentración: 7.424×10^8

Metodología



Dosis Letal Media (DL 50) y uso en campo (DL90)



Dilución de las soluciones concentradas: $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$

$$7,24 \times 10^7 * X = 1 \times 10^7 * 40 \text{ml}$$

$$X = \frac{1 \times 10^7 * 40 \text{ml}}{7,24 \times 10^7}$$

$$\text{Tratamiento 1 (} \times 10^7 \text{)} = 6,73 \text{ ml}$$

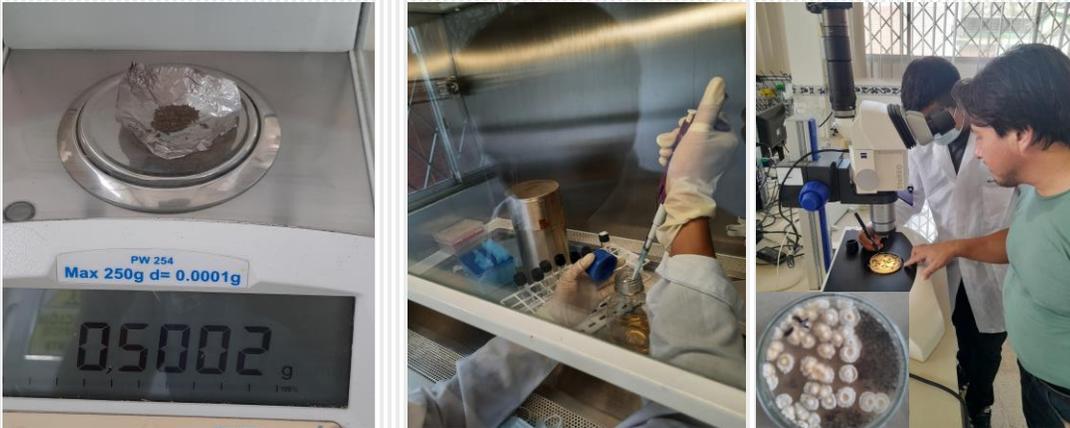
Tiempo Letal Media (TL 50)

Metodología

Tiempo de supervivencia de conidias en el sustrato.



Toma de datos



Mediante la fórmula $\text{UFC} / \text{g o ml} = \text{Promedio \# de colonias} \times \text{factor de dilución}$.



04. Resultados y discusión

Dosis infectiva ideal en sustrato estéril y no estéril

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

Medias con una letra común no son significativamente diferente, Tuckey (p-Valor < 0,001)

SUSTENTACIÓN

Rivera et al.,(2021)

Determina que cepas de *M. anisopliae* presenta mayor porcentaje de micosis sobre huevo de *R. microplus* con un porcentaje de 90.80 y 100% estos resultados en huevos de 3 días de edad a una concentración de 1×10^7 conidios/mL.

SUSTENTACIÓN

Arguedas et al., (2008)

Menciona la eficacia *M. anisopliae* sobre la reducción de eclosión de los huevos de *B. microplus* que fueron de 10^8 , 10^9 , 10^{10} tratados a concentraciones de estas concentraciones fueron aplicadas en 1 gr de huevos. Obteniendo un 82.73 % a una concentración de 10^8 .

SUSTENTACIÓN

Kaaya et al., (1996)

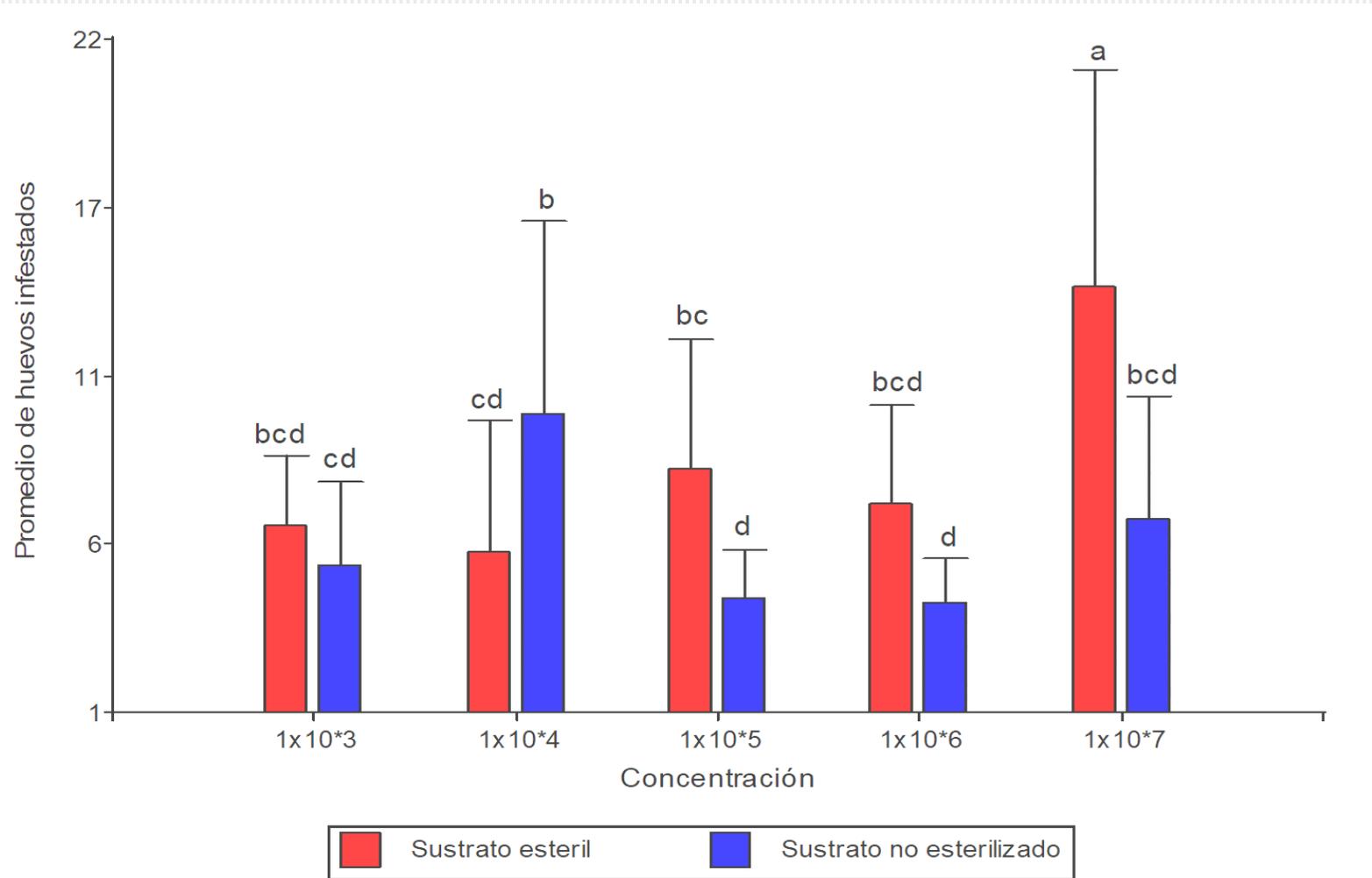
Explica en su estudio que *Beauveria Bassiana* y *M. anisoplae* indujeron una mortalidad en adultos, la fecundidad y la eclosión de los huevos en *Rhipicephalus appendiculatus*

SUSTENTACIÓN

Vega (2018)

Menciona que hongos endófitos pueden afectar el establecimiento de otro hongo como *Beuaveria bassiana*, además estos pueden influir en su establecimiento y aspectos que estén asociados con el hongo como la especie, cepa, concentración de inóculo.

Dosis infectiva ideal en sustrato estéril y no estéril



10^3



10^4



10^5



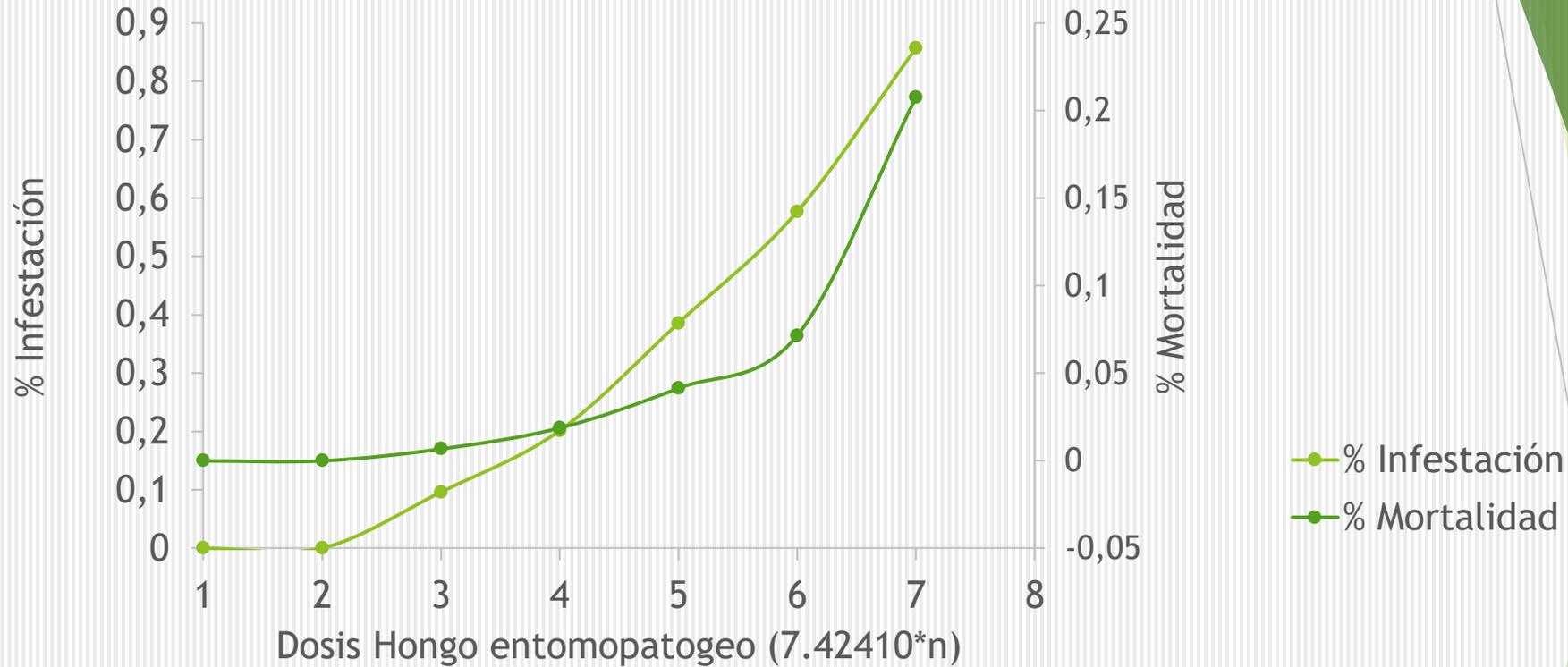
10^6



10^7



Factor de correlación para Dosis letal de *Beauveria* spp en suelo estéril



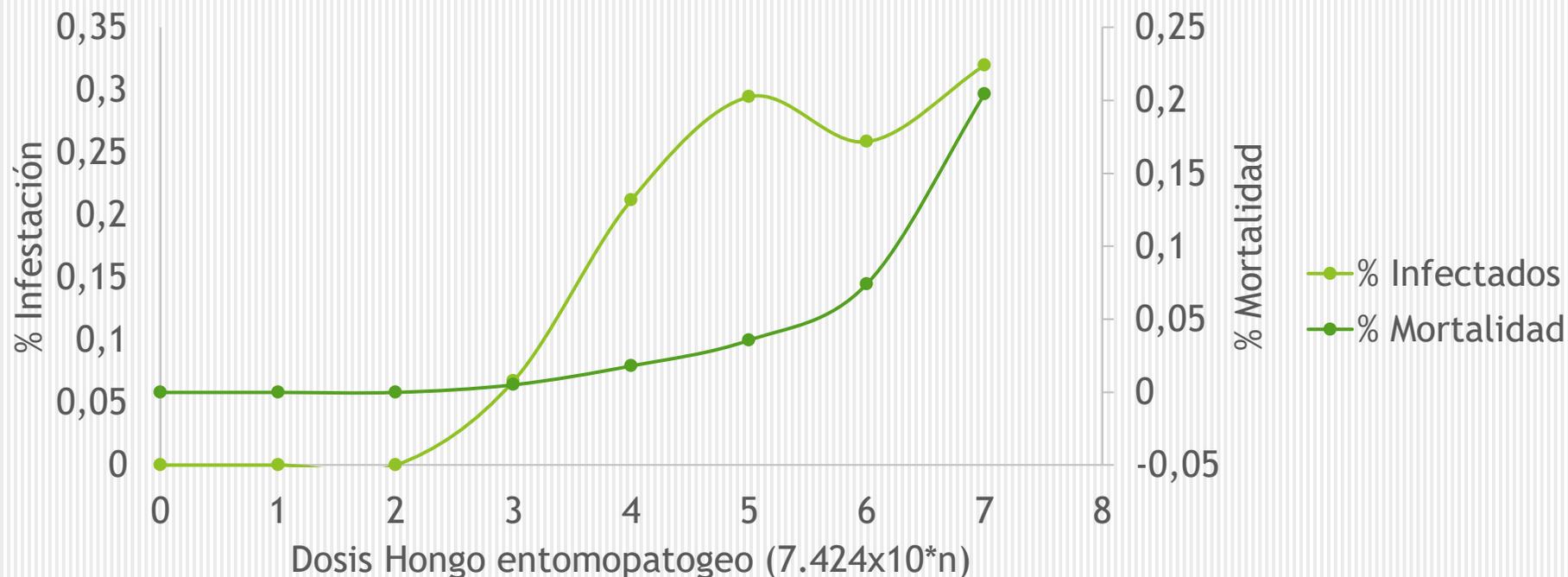
SUSTENTACIÓN

Gindin et al.,
(2009)

la eficacia ovicida de dos hongos hifomicetos entomopatógenos: *Metarhizium anisopliae* variedad *acridum* y *anisoplae*. Estos 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 de control. Determinando que son muy virulentos para huevos de garrapata, reduciendo los porcentajes de eclosión al 2-6%, pero estos reportan que no influyeron en la eclosión.

Factor de correlación de la Dosis letal en suelo no estéril

Efecto ovicida de *Beuaveria* sp. Suelo No esteril.



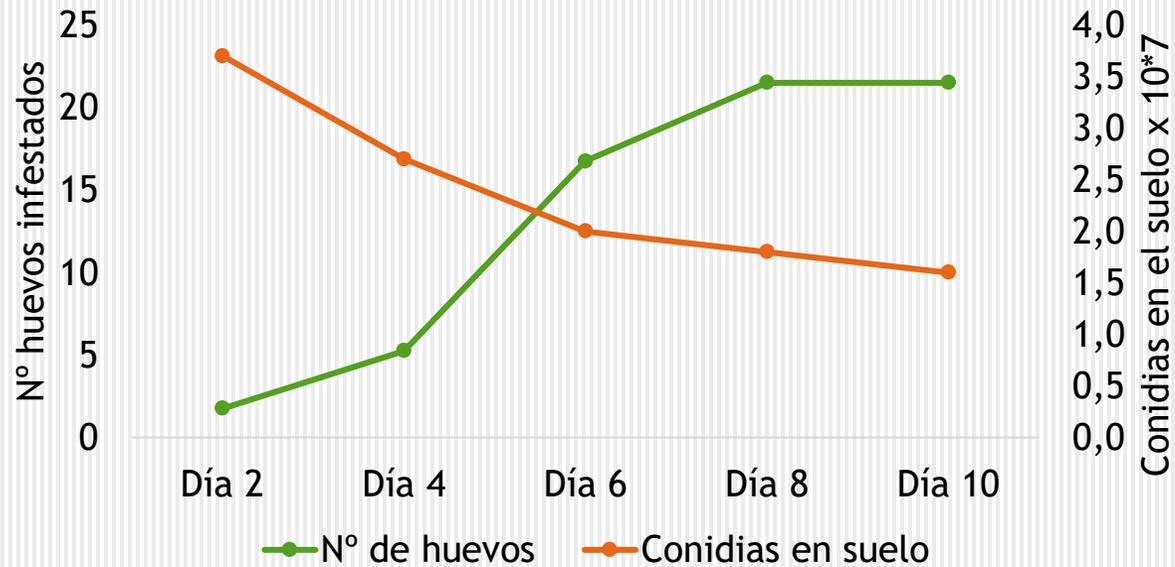
SUSTENTACIÓN

Nunez et al.,
(2019)

En su estudio de investigación determinan que existe una reducción significativa *M. anisopliae* y *B. bassiana*, logrando reducir significativamente los índices reproductivos respecto a un testigo como estudio. Demostrando que *M. anisopliae* disminuye la eclosión de los huevos en un 21.78% y logrando *B. bassiana* un 23.37%.

Número de huevos infestados y concentración de conidias en el suelo

Tiempo	\bar{x} huevos infestados	D.E.	\bar{x} conidias en suelo	D.E.
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



SUSTENTACIÓN

Rivera et al., (2021)

Evaluó que el porcentaje de micosis de *M. anisoplae* sobre huevo de *R. annulatus* concluyendo que los huevos más jóvenes son más susceptibles a infecciones por los hongos entomopatógenos de la especie *M. anisoplae* a concentraciones de 2.5×10^5 y 2.5×10^6 conidias/cm². La micosis de los huevos de mayor edad alcanzó un 98 a 100%, mientras que huevos más jóvenes fue de 23 a 35%.

SUSTENTACIÓN

Gindin et al., (2009)

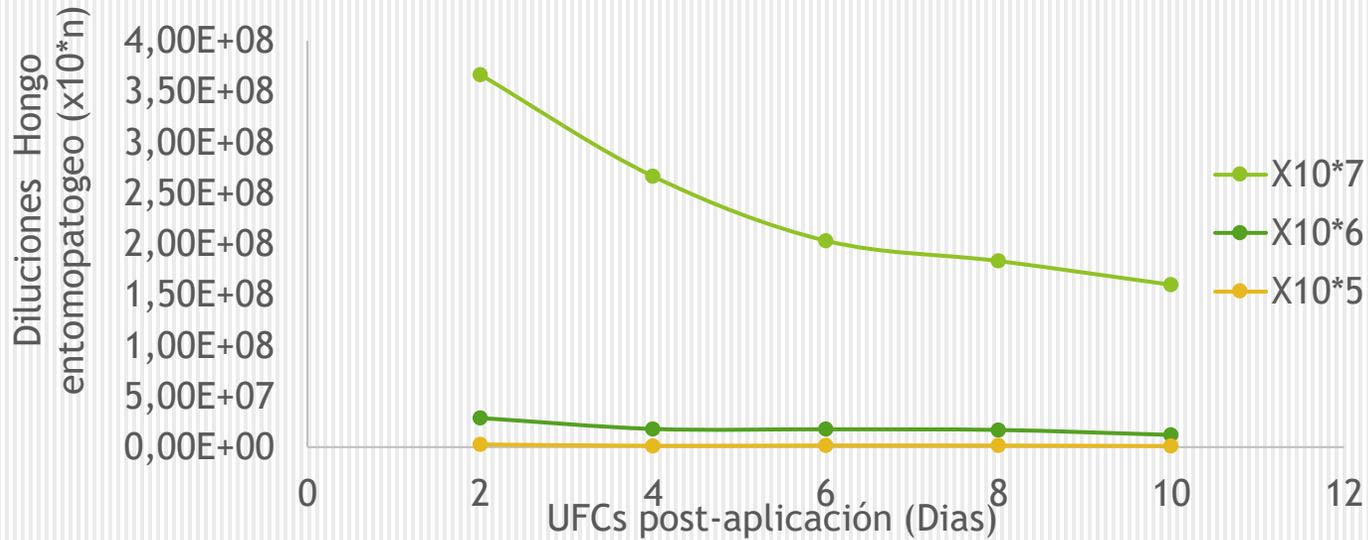
También da a conocer que huevos de garrapata más viejos tenían una mayor susceptibilidad a la infección por hongos entomopatógenos que los que eran recién ovipositados.

SUSTENTACIÓN

(Rivera, y otros, 2021)

Estos resultados tienen similitud que hongos entomopatógenos evaluados de *Metarhizium anisoplae* y *Cordyceps bassiana* a concentraciones de 1×10^7 conidias/mL son patógenos para los huevos de garrapata *R. microplus* de tres, ocho y diecisiete días de edad.

Tiempo letal (DL) concentración conidias en el suelo.



2 días/x10⁸



4 días/x10⁸



6 días/x10⁸



8 días/x10⁸



10 días/x10⁸

SUSTENTACIÓN

Pozo et al., (2018); Briones et al., (2021); Tofiño et al., (2018)

Que la mortalidad de neo larvas de garrapata superan el 90% a partir de las concentraciones de x10⁷conidias/mL.

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 $7,424 \cdot 10^7$.
- 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.
- 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 $x10^7$ 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 y que no 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.

**GRACIAS POR
SU ATENCIÓN**

