

Evaluación del efecto acaricida de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control de la garrapata *Rhipicephalus microplus*

Tipás Viteri, Jemmy Daniela

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Chávez Larrea, María Augusta, MSc.

22 de septiembre del 2020

URKUND

Document Information

Analyzeddocument Daniela-Tipás-Trabajo-Titulación_urkund.docx (D83072584)

Submitted 10/29/2020 4:25:00 AM

Submitted by

Submitteremail jdtipas@espe.edu.ec

Similarity 2%

Analysisaddress machavez.espe@analysis.urkund.com

Sources included in the report

W	URL: https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8952/Trabajo%20de%20gra Fetched: 2/6/2020 9:53:17 PM	 5
W	URL: https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/Crimea_Co ... Fetched: 10/29/2020 4:26:00 AM	 1
SA	PROYECTO DE TESIS FINAL SIN GRÁFICOS.doc Document PROYECTO DE TESIS FINAL SIN GRÁFICOS.doc (D19476276)	 1
SA	PROY INV - DEIVY GUEVARA 19.09.2018.docx Document PROY INV - DEIVY GUEVARA 19.09.2018.docx (D41593346)	 2
SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / tesis garrapatas dvms final biblioteca.doc Document tesis garrapatas dvms final biblioteca.doc (D54527297) Submitted by: jotigrero@espe.edu.ec Receiver: jotigrero.espe@analysis.urkund.com	 1
W	URL: https://docplayer.es/67151705-Evaluación-in-vitro-del-efecto-de-cordyceps-beauveri... Fetched: 2/6/2020 6:02:11 PM	 4

Firma:



Firmado digitalmente por:
MARIA AUGUSTA
CHAVEZ LARREA

Chávez Larrea, María Augusta, MSc.

C. C. 0201274842



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, “**Evaluación del efecto acaricida de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control de la garrapata *Rhipicephalus microplus*”** fue realizado por la señorita **Tipás Viteri, Jemmy Daniela** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 22 de septiembre de 2020

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**MARIA
AUGUSTA
CHAVEZ
LARREA**

.....
Chávez Larrea, María Augusta, MSc.

C. C. 0201274842



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Tipás Viteri, Jemmy Daniela**, con cédula de ciudadanía n° 1720758786, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Evaluación del efecto acaricida de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control de la garrapata *Rhipicephalus microplus*** 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.

Sangolquí, 22 de septiembre de 2020

Firma

Tipás Viteri, Jemmy Daniela

C.C.: 1720758786



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Tipás Viteri, Jemmy Daniela**, con cédula de ciudadanía n° 1720758786, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Evaluación del efecto acaricida de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control de la garrapata *Rhipicephalus microplus*** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 22 de septiembre de 2020

Firma

Tipás Viteri, Jemmy Daniela

C.C.:1720758786

Dedicatoria

A los seres que iluminan mis días con su amor, mis padres. Este logro se los dedico a ustedes, ya que es fruto de su apoyo incondicional.

A Anthony y Sebastián, va dedicado a ustedes porque son mi esperanza, alegría, y la fuerza que me impulsa a no rendirme nunca.

Agradecimientos

A mis padres, José y Janeth, gracias por caminar junto a mi en cada milímetro de aciertos y equivocaciones y ser el pilar fundamental de mi vida y por las siempre acertadas palabras para impulsarme a dar lo mejor de mi.

A la empresa Yura Biosearch, por la colaboración brindada para la disponibilidad de las cepas usadas, así como en el financiamiento, soporte humano y logístico en la realización de este estudio. Un agradecimiento especial a la Ing. Pamela Espín y la Ing. María José Cañizares, por las enseñanzas, la confianza, la amistad y el apoyo técnico científico impartido.

A Diego Navas, dueño de la finca “La Maminita”, por su colaboración y disposición de su finca ganadera.

A Sandra Enríquez, investigadora del Instituto de Investigación en Zoonosis (CIZ) por su conocimiento y técnicas impartidas en la identificación morfológica de la especie de garrapatas en estudio.

A María Augusta Chávez, directora del proyecto, por su guía y apoyo para llevar a cabo este estudio.

A mi papi Antonio, gracias por creer en mis sueños y proyectos, se que desde el cielo me da la bendición y las fuerzas para seguir adelante.

A Stiwar, por su motivación, fuerzas, ánimos y amor. Gracias por ser la persona con la que he ido destruyendo miedos y construyendo sueños.

A mis amigos, gracias por su cariño, apoyo y verdadera amistad a lo largo de estos años.

Por último, gracias al personal docente de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE quienes me han formado académicamente y a través de su conocimiento me han permitido convertirme en una profesional.

Índice de Contenidos

Análisis Urkund	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de Contenidos	8
Índice de Tablas	12
Índice de Figuras	13
Índice de Abreviaturas.....	14
Resumen	15
Abstract.....	16
Capítulo 1: Introducción	17
Antecedentes	17
Área de influencia.....	18
Formulación del problema	19
Justificación o importancia del problema a resolver	20
Objetivos de la investigación.....	21
Objetivo general.....	21

Objetivos específicos	21
Marco teórico	22
Garrapata del ganado bovino	22
Clasificación taxonómica.....	22
Morfología General.....	24
Ciclo biológico	25
Efectos de la garrapata en el ganado.....	25
Perdidas económicas ocasionadas por las garrapatas	26
Especies de garrapatas identificadas en el Ecuador	27
Métodos de control químico de garrapatas	31
Métodos de control biológico de garrapatas	31
Generalidades de <i>Metarhizium anisopliae</i>	32
Generalidades de <i>Beauveria bassiana</i>	32
Proceso de infección	33
Adhesión	34
Penetración.....	34
Replicación.....	35
Hipótesis	36
Capítulo 2: Materiales y Métodos	37
Participantes.....	37
Zona de estudio.....	37
Trabajo de laboratorio	37
Trabajo de campo	37

	10
Período de investigación	38
Recolección de garrapatas	38
Identificación morfológica de garrapatas	39
Clave para la identificación de los géneros de garrapatas adultas en el Ecuador	39
Obtención de los hongos <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	40
Reactivación de hongos <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	40
Preparación y control de calidad del inóculo	42
Determinación de la concentración de esporas (conidios)	42
Determinación del porcentaje de germinación	45
Determinación del porcentaje de pureza	46
Inoculación	47
Evaluación de la mortalidad	48
Estimación concentración letal media (CL50) y tiempo letal medio (TL50) de <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>	48
Capítulo 3: Resultados	49
Identificación morfológica de las garrapatas recolectadas en la finca ganadera	49
Cultivos puros obtenidos y características macroscópicas	52
Cultivos puros obtenidos y características microscópicas	53
Porcentaje de mortalidad de las garrapatas expuestas a <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium</i> <i>anisopliae</i>	55
Concentración letal media (CL50) de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>	57

Tiempo letal medio (TL50) de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>	59
Capítulo 4: Discusión	63
Identificación morfológica de la especie de garrapata en el lugar de muestreo	63
Identificación de conidias puras de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	65
Influencia de la concentración de esporas por mililitro en el porcentaje de mortalidad	65
Análisis del CL50 (Concentración letal media) para <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	67
Análisis del TL50 (Tiempo letal media) para <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	68
Capítulo 5: Conclusiones.....	69
Capítulo 6: Recomendaciones	70
Bibliografía	71
Anexos	83

Índice de Tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica de las garrapatas duras y blandas.....	23
Tabla 2 Garrapatas identificadas en el Ecuador.....	29
Tabla 3 Conteo de esporas (conidios) de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> mediante cámara de Neubauer	44
Tabla 4 Concentraciones de los hongos entomopatógenos <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> empleadas en la evaluación del efecto acaricida en el control de la garrapata <i>R. microplus</i>	45
Tabla 5 Porcentaje de germinación de inóculos formados por <i>M. anisopliae</i> y <i>B. bassiana</i>	46
Tabla 6 Porcentaje de pureza de inóculos formados por <i>M. anisopliae</i> y <i>B. bassiana</i>	46
Tabla 7 Análisis estadístico del ensayo de inoculación de formulaciones de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> a diferentes concentraciones en garrapatas en estado adulto	47

Índice de Figuras

Figura 1 Fincas en zona costera ecuatoriana con presencia de garrapatas en ganado bovino.....	28
Figura 2 Infección por hongos entomopatógenos a huéspedes artrópodos	33
Figura 3 Recolección de garrapatas.....	39
Figura 4 Limpieza y desinfección de <i>Rhipicephalus microplus</i>	41
Figura 5 Reactivación y conservación de cepas <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	42
Figura 6 Metodología de conteo de células en cámara de Neubauer	43
Figura 7 <i>Rhipicephalus microplus</i> hembra.....	49
Figura 8 Gnatosoma <i>Rhipicephalus microplus</i> hembra	50
Figura 9 <i>Rhipicephalus microplus</i> macho	51
Figura 10 Gnatosoma <i>Rhipicephalus microplus</i> macho	51
Figura 11 Cultivos puros aislados de <i>Beauveria bassiana</i>	52
Figura 12 Cultivos aislados puros de <i>Metarhizium anisopliae</i>	53
Figura 13 Tinción con azul de lactofenol de <i>Beauveria bassiana</i>	54
Figura 14 Tinción con azul de lactofenol de <i>Metarhizium anisopliae</i>	54
Figura 15 Número de garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i> en estado adulto muertos por acción de diferentes concentraciones de <i>B. bassiana</i>	55
Figura 16. Número de garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i> en estado adulto, muertos por acción de diferentes concentraciones de <i>M. anisopliae</i>	56
Figura 17 <i>R. microplus</i> en estado adulto, colonizado con <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	57
Figura 18 Concentración letal media de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>	58
Figura 19 Tiempo letal medio para diferentes concentraciones de <i>B. bassiana</i>	60
Figura 20 Tiempo letal medio para diferentes concentraciones de <i>M. anisopliae</i>	61

Índice de Abreviaturas

CL50: Concentración letal media

TL50: Tiempo letal medio

UFC: Unidades formadoras de colonias

PDA: Papa dextrosa agar

AA: Agar agua

SDA: Agar Sabouraud Dextrosa

drc: Dose response curves analyses

drm: Dose response model

Resumen

La infestación por garrapatas es una de las principales limitantes en la ganadería ya que acarrearán daños directos e indirectos a los bovinos, un aumento en los costos requeridos para su eliminación y resistencia adquirida a acaricidas químicos, razones necesarias para aplicar nuevas alternativas en su control. El presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto acaricida de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control biológico de *Rhipicephalus microplus* en su fase adulta. Las garrapatas fueron recolectadas de ganado vacuno en una finca ganadera, ubicada en San Miguel de los Bancos, provincia de Pichincha. Las evaluaciones del efecto acaricida se llevaron a cabo a nivel *in vitro*, las garrapatas fueron expuestas a cuatro concentraciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae*: $1,6 \times 10^5$; $1,01 \times 10^6$; $1,003 \times 10^7$ y $1,003 \times 10^8$ esporas/ml. La mortalidad del 100% de los ectoparásitos tratados con $1,003 \times 10^8$ esporas/ml de *M. anisopliae* se dio a los 13,5 días y empleando la misma concentración, *B. bassiana* generó la muerte de todas las garrapatas a los 14,5 días. El análisis CL50, mostró que la mínima concentración de *B. bassiana* para eliminar este ectoparásito es $6,7670 \times 10^4$ esporas/ml y para *M. anisopliae* $7,06945858 \times 10^4$ esporas/ml. Con respecto a la evaluación TL50, la concentración $1,003 \times 10^8$ esporas/ml fue la primera en alcanzar el tiempo letal medio en 5,2 días para *M. anisopliae* y 5,3 días para *B. bassiana*.

Palabras clave:

- **RHIPICEPHALUS MICROPLUS**
- **METARHIZIUM ANISOPLIAE**
- **BEAUVERIA BASSIANA**
- **CONTROL BIOLÓGICO**
- **CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL50)**

Abstract

Tick infestation is one of the main limitations in livestock as they cause direct and indirect damage to cattle, an increase in the costs required for their elimination and acquired resistance to chemical acaricides, necessary reasons to apply new alternatives in their control. The present study aimed to determine the acaricidal effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the biological control of *Rhipicephalus microplus* in its adult phase. The ticks were collected from cattles, in a farm located in San Miguel de los Bancos, Pichincha province. Evaluations of the acaricidal effect were carried out at the *in vitro* level, the ticks were exposed to four concentrations of *B. bassiana* and *M. anisopliae*: $1,6 \times 10^5$; $1,01 \times 10^6$; $1,003 \times 10^7$ y $1,003 \times 10^8$ spores/ml. The mortality of 100% of the ectoparasites treated with $1,003 \times 10^8$ spores/ml of *M. anisopliae* occurred at 13.5 days and using the same concentration, *B. bassiana* caused the death of all ticks at 14.5 days. The LC50 analysis showed that the minimum concentration of *B. bassiana* to eliminate this ectoparasite is $6,7670 \times 10^4$ spores / ml and for *M. anisopliae* $7,06945858 \times 10^4$ spores/ml. Regarding the TL50 evaluation, the concentration $1,003 \times 10^8$ spores/ml was the first to reach the mean lethal time in 5.2 days for *M. anisopliae* and 5.3 days for *B. bassiana*.

Key words:

- **RHIPICEPHALUS MICROPLUS**
- **METARHIZIUM ANISOPLIAE**
- **BEAVERIA BASSIANA**
- **BIOLOGICAL CONTROL**
- **MEDIAN LETHAL CONCENTRATION (LC50)**

Capítulo 1: Introducción

Antecedentes

Según D. Polanco & Alberto (2016), a nivel mundial las garrapatas se encuentran parasitando cerca del 80% del ganado vacuno, mientras que en el Ecuador de las aproximadamente 5 millones de reses destinadas a la producción de carne y leche, 3750000 se encuentran en zonas infestadas o con potencial de infestación por estos ectoparásitos, generando una gran preocupación en la economía del país, ya que la industria ganadera es uno de los principales sectores productivos, aportando alrededor del 8% del PIB (Producto Interno Bruto), el cuál puede incrementarse al 30% de considerarse toda la cadena de valor de sus productos agropecuarios derivados, además representa el 30% de las exportaciones (sin considerarse el sector petrolero) y aporta con empleo a más de 280 mil productores ganaderos ecuatorianos (Castillo Vélez, 2015).

En el Ecuador existen más de 40 especies de garrapatas pertenecientes a los géneros *Amblyomma spp.*, *Dermacentor spp.*, *Haemaphysalis spp.*, *Ixodes spp.*, *Rhipicephalus spp.* Nava et al. (2014) menciona a *Rhipicephalus microplus* y *Amblyomma cajennense* como los principales ectoparásitos en Ecuador y en varios países de América del Sur. Estas especies se encuentran documentadas por su relevancia veterinaria y medica, pues generan pérdidas de peso de 0,26kg/garrapata/año en el caso de una infestación de *R. microplus*, mientras que para *Amblyomma spp.*, la pérdida es de 1,09kg/garrapata/año (Jonsson, 2006).

Entre los impactos negativos que acarrearán estas plagas se encuentran: baja producción de carne y leche, daño a las pieles de los hospederos, problemas reproductivos y la transmisión de enfermedades, como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* y *Theileria parva* (Cortés Jesús Alfredo, 2018).

La estrategia más usada para el control de las garrapatas en el Ecuador son los productos sintéticos: amitraz, ivermectina y alfa-cipermetrina, los cuales son empleados de manera activa en aproximadamente 42%, 39%, 24% de fincas ecuatorianas, respectivamente (Pérez, 2016). El uso constante de estos productos en varias dosis, concentraciones, intervalos entre tratamientos y métodos de aplicación, han generado la formación de poblaciones de garrapatas resistentes a la acción de acaricidas químicos (Rodríguez-Vivas, Jonsson, & Bhushan, 2018).

Como alternativa a la eliminación de garrapatas, se encuentran los controladores biológicos. En el 2004 se registraron 117 productos a base de microorganismos entomopatógenos por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) (Kabaluk & Gazdik, 2005). Los hongos de los géneros *Metarhizium*, *Paecilomyces* y *Beauveria* presentan ventajas frente a los acaricidas químicos, pues además de controlar las poblaciones de garrapatas, no contaminan el ambiente, ni afectan a vertebrados, incluso existen cepas que presentan cierto grado de especificidad, protegiendo de esta forma la fauna benéfica (Lopez, 2016). Sin embargo este tipo de microorganismos se ven influenciados por condiciones ambientales, frente a esto, la microencapsulación brinda protección a las conidias contra condiciones climáticas adversas, lo que a su vez se ve reflejado en el incremento de su eficacia (Fernandes, Bittencourt, & Roberts, 2012).

Área de influencia

El presente estudio está encaminado a probar nuevas alternativas de tratamiento contra la garrapata *R. microplus*, empleando controladores biológicos a base de hongos fitopatógenos que presenten actividad antagonista frente a estos parásitos, con el fin de generar estrategias de control efectivas, amigables con el medio ambiente, baja toxicidad en los animales, y en el personal que se encargue de su aplicación, evitar la aparición de

poblaciones de garrapatas resistentes a controladores químicos y de esta forma mejorar la condición de vida de los ganaderos en donde las garrapatas son un problema.

Formulación del problema

La infestación del ganado vacuno por garrapatas se ha convertido en uno de los mayores problemas sanitarios en las regiones tropicales y subtropicales del Ecuador, a nivel de ganadería. El uso de acaricidas químicos, en tópicos, formulaciones acuosas o pulverizaciones, es el principal medio de control para estos ectoparásitos, su eficiencia se ha demostrado a nivel *in vitro* e *in vivo*, sin embargo presentan desventajas como toxicidad por parte del ganado, deposición en productos de consumo final como leche y carne y la aparición de poblaciones de garrapatas resistentes, causado por factores intrínsecos relacionados con la ecología, genética y biología de los ixodoideos y factores operativos relacionados con el manejo de concentraciones y dosis de los métodos de control (Abbas, Zaman, Colwell, Gilleard, & Iqbal, 2014; Díaz, Rodríguez, Fragoso, & Cruz, 2006).

Los productos químicos han jugado un papel muy importante en el control de la garrapata, en varios países, *R. microplus* ha desarrollado resistencia más rápido en comparación a garrapatas que afectan a múltiples hospederos. En el Ecuador en un estudio realizado por R. Rodríguez et al., (2017) encontró que el 67% de garrapatas presentaron resistencia a amitraz, 50% para alfa-cipermetrina y del 25% al 42% para ivermectina, en otro estudio Maya-Delgado et al., (2020) investigaron 84 granjas ganaderas ubicadas en Santo Domingo de los Tsáchilas, y registraron que el 62% de garrapatas presentaron el alelo de resistencia a amitraz.

Otro de los problemas generados por el uso de acaricidas químicos es el daño ecológico, ya que no solo eliminan a diferentes plagas como las garrapatas sino también a una gran cantidad de insectos benéficos (Lopez, 2016). Las moléculas de los acaricidas sintéticos de la actualidad tienen una vida promedio de 100 años, en los Laboratorio del Centro Universitario de

Estudios de Investigación de Proyectos, S.C. encontraron trazas de estos productos en aguas subterráneas, las cuales contaminaron varios organismos, generando un escenario cancerígeno para el hombre (Pascual, 2014).

Por el contrario los hongos entomopatógenos además de ser efectivas contra plagas como garrapatas, no contaminan el medio ambiente por su composición natural, no genera daños en la fauna benéfica, no son tóxicos para el ser humano, no dejan residuos en el organismo del bovino y no desarrollan resistencia (Pascual, 2014).

Justificación o importancia del problema a resolver

Rhipicephalus microplus es la especie de garrapata con mayor impacto económico en América, África, Asia y Australia (Vinueza, 2015). En el Ecuador, por tener temporadas climáticas inestables, favorecen el desarrollo de garrapatas y otras plagas (Alvarez, Bonilla, & Chacón, 2003). En consecuencia, se han desarrollado varios enfoques que permiten controlar a esta plaga, como eliminación manual, selección de huéspedes resistentes, manejo de pastos, extractos vegetales (*Heterorhabditis* spp. y *Steinernema* spp.), depredadores naturales como hormigas y aves, aceites esenciales, acaricidas químicos y biológicos, entre otros (Rodríguez-Vivas et al., 2018).

El empleo de biocontroladores de plagas como hongos entomopatógenos permitirá reducir los individuos resistentes a acaricidas, manteniendo niveles deseados de productos derivados del ganado vacuno Ming et al., (2011). Los hongos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii* presentan potencial para reducir eficazmente las poblaciones de garrapatas sin generar daños al ambiente, animales ni a personas que apliquen estos productos o que sean consumidoras finales de leche y carne (J. A. Fernández, 2006). Estudios realizados en Honduras en el 2006, comprobaron que a nivel *in vitro* las larvas de garrapatas

fueron susceptibles a *B. bassiana*, obteniéndose un 90% de mortalidad, mientras que a nivel *in vivo* se registró un 80% (Fernández Tondelli, 2006).

En una prueba *in vivo*, Leemon, Turner, & Jonsson (2008) obtuvieron el 100% de mortalidad de garrapatas, al aplicar *M. anisopliae*, con el paso de los días este porcentaje disminuyó, por lo que se hizo evidente la interacción entre la garrapata, el hongo y el ambiente. En otro estudio *in vivo* realizado en México por Sahagún et al. (2010) se evidenció el 94% de mortalidad en larvas de *R. microplus*, tras entrar en contacto con *M. anisopliae*

En el Ecuador Piguave (2016) realizó una investigación para determinar la acción de *Lecanicillium lecanii* como controlador de garrapatas obteniendo un 81% de mortalidad, mientras que Morocho, en su estudio *in-vivo* realizado en El Chaco-Ecuador, determinó que la eficacia contra garrapatas de *Metarhizium anisopliae* fue del 44,16% y para *Beauveria bassiana* fue de 54,19%, estos valores no pueden competir contra los registrados por el tratamiento químico (Morocho, 2019).

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Evaluar el efecto acaricida de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, en el control de la garrapata *Rhipicephalus microplus*.

Objetivos específicos

- Recolectar e identificar la especie de garrapata presente en el sitio de investigación.
- Determinar la mortalidad *in vitro* de las garrapatas en estado adulto producida por una dilución de conidias puras de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.
- Estimar la concentración letal media (CL50) y tiempo letal medio (TL50) de *B. bassiana* y *M. anisopliae* para el control microbiano de la garrapata *Rhipicephalus microplus*.

Marco teórico

Garrapata del ganado bovino

Las garrapatas del ganado bovino son un grupo de ectoparásitos obligados, se alimentan esencialmente de sangre y otros fluidos de las vacas a las cuales parasita, pertenecen a la familia Ixodidae, y se encuentran distribuidas en regiones templadas, subtropicales y tropicales (Polanco & Alberto, 2016).

En la salud pública y animal, las garrapatas son importantes ya que son transmisoras de agentes infecciosos y graves enfermedades en sus hospederos. Los microorganismos transmitidos por los ectoparásitos son protozoarios del género *Babesia*, bacterias del género *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Rickettsia* y *Borrelia* y agentes de la piroplasmosis equina del género *Theileria* (Onofrio, Barros, Labruna, & Faccini, 2009).

Las infestaciones de garrapatas provocan efectos negativos como estrés, decaimiento, anemia, disminución en la productividad del animal, parálisis y pueden llegar a causar la muerte. Por ello con el fin de disminuir la población de garrapatas presentes en el ganado, se han empleado comúnmente químicos debido a su amplio rango de control, sin tomar en consideración los daños ocasionados hacia al ambiente, animales, personas encargadas de su aplicación, además de producir un progresivo aumento en la resistencia a este parásito, y por ende un incremento en los residuos de acaricidas en leche y carne (Broglio et al., 2012). El costo aproximado que involucra el control del ectoparásito y las enfermedades transmitidas al ganado se estima en 13,9 a 18,7 billones de dólares anuales (Burger, Shao, & Barker, 2014).

Clasificación taxonómica

En la actualidad del cual cuál se ha reconocido más de 896 especies de garrapatas. Estos ectoparásitos pertenecen a la familia Artropoda, clase Arachnida, orden Acarina, suborden

Ixodoidea, dentro del cual existen tres familias: Ixodidae ó garrapatas duras, Argasidae ó garrapatas blandas y Nuttalliellidae el cual posee una única especie, *Nuttalliella namaqua* (Guglielmone et al., 2010).

Ixodidae cuenta con 12 géneros y 600 especies, Argasidae presenta 4 géneros y 190 especies y Nuttalliellidae el cual posee una única especie, *Nuttalliella namaqua* (Tabla 1), sin embargo no existe un acuerdo general sobre la sistemática de los grupos lo que genera distintos números por especie dependiendo de los autores (A. Estrada, 2015).

Tabla 1

Clasificación taxonómica de garrapatas duras y blandas

	Familia		
	Ixodidae	Argasidae	Nuttalliellidae
Género	<i>Ixodes</i>	<i>Argas</i>	<i>Nuttalliella</i>
	<i>Amblyomma</i>	<i>Carios</i>	
	<i>Anomalohimalaya</i>	<i>Ornithodoros</i>	
	<i>Bothriocroton</i>	<i>Otobius</i>	
	<i>Cosmiomma</i>		
	<i>Dermacentor</i>		
	<i>Haemaphysalis</i>		
	<i>Hyalomma</i>		
	<i>Margaropus</i>		
	<i>Nosomma</i>		
	<i>Rhipicentor</i>		
	<i>Rhipicephalus</i>		

Nota: Recuperado de Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria. 17(1):81-95

Morfología General

Las garrapatas presentan un cuerpo redondeado, sin segmentos llamado idiosoma, en sus laterales pueden llevar uno o dos pares de ojos dependiendo de la especie. La familia Ixodidae se caracteriza por la presencia de su escudo el cual es una placa esclerotizada que en los machos cubre prácticamente por completo la superficie dorsal, limitando su expansión, mientras que en las hembras cubre únicamente la mitad anterior, permitiéndoles ingerir una gran cantidad de sangre, en la zona que no están cubiertas por el escudo se forma una cutícula la cual permite la dilatación del volumen corporal. La familia Argasidae no presenta el escudo y por esto reciben el calificativo de garrapatas blandas. Las piezas bucales en todas las especies se encuentran separadas del idiosoma, a esta zona se le conoce como capítulo, el cual presenta dos palpos, dos quelíceros, con un par de dientes y un hipostoma con varias filas de dientes, empleados en el anclaje hacia la piel del animal parasitado. En los ixódidos el capítulo se encuentra en la cara anterior, en las hembras de esta familia encontramos áreas porosas en esta zona y algunos machos tienen escudos ventrales quitinizados, mientras que en los argásidos el capítulo se encuentra en la cara ventral (A. Estrada, 2015).

En algunas garrapatas en estado inmaduro y en garrapatas adultas se presentan placas espiraculares, donde se origina el sistema de traqueolas respiratorias. Las placas se ubican a los lados del cuerpo y todas con excepción de las larvas presentan cuatro pares de patas, cada una posee seis segmentos (Navarrete, Rodríguez, Valle, Vargas, & Romero, 2014).

Los argásidos se caracterizan por poseer una superficie corporal con aspecto reticulado, sus placas espiculares son pequeñas, y algunos se encuentran entre los pliegues de la cutícula. Esta familia presenta un poro coxal, ubicado en la coxa I en adultos y en algunos estados ninfales, su función es concentrar el exceso de agua para una rápida eliminación de la misma mientras ocurre la ingesta de sangre (A. Estrada, 2015).

Ciclo biológico

El ciclo biológico de las garrapatas consta de cuatro estadios, huevo, larva, ninfa y adulto. La diferencia del sexo se da únicamente en el estadio adulto, por tanto, cuando se haga referencia a machos o hembras, se está hablando de garrapatas adultas (Barandika, 2010).

El macho se acopla a la superficie cutánea de la hembra la cuál requiere succionar sangre para una adecuada maduración de los huevos. Las hembras repletas de sangre también llamadas teleoginas se dejan caer del animal parasitado al suelo y en un lapso de aproximadamente 30 días ocurre la eclosión de las larvas, la especie *Boophilus* dispone entre 2000 y 3000 huevos mientras que *Amblyomma* dispone hasta 5000 huevos. Factores como sequías y altas temperaturas afectan el desarrollo de los huevos y también de las larvas (Calox, 2012). La fase de maduración de la larva inicia cuando estas se encuentran en el ambiente, el cuál dura de 4-7 días tras la eclosión, y se espera obtener una larva fisiológicamente óptima para parasitar al hospedador (Piguave, 2016).

Las larvas prefieren parasitar en horas de la mañana cuando la temperatura es fresca, mientras que en las horas de calor las larvas se protegen descendiendo al pasto, en el caso de no encontrar un hospedador, las larvas pueden permanecer en el medio ambiente entre 60 y 70 días (Calox, 2012).

Efectos de la garrapata en el ganado

Las garrapatas provocan daños directos en el ganado como la destrucción tisular, provocada cuando los apéndices bucales de los ectoparásitos entran en contacto con el hospedador generando una reacción inflamatoria local, el expolio de sangre es un daño directo que puede provocar anemias agudas y la parálisis provocada por toxinas provenientes de la saliva de las garrapatas puede incluso llevar a la muerte del animal. Además de estos daños, las

garrapatas son importantes transmisores de patógenos como *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* y *Anaplasma marginale* (Gragera, Roncero, Montes, & Habela, 2005).

Las garrapatas se encuentran parasitando cerca del 80% del ganado vacuno a nivel mundial, generando una fuerte repercusión económica, bajo este punto de vista los géneros más importantes son: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Ixodes* y *Rhipicephalus* (Piguave, 2016).

La importancia de estos parásitos obligados adaptados a una gran variedad de clima y hospedadores radica en que son vectores de enfermedades parasitarias, bacterianas y víricas cuyos daños representan una acción traumática, tóxica e infecciosa en el ganado y a su vez una disminución en los productos de consumo final como leche y carne, dificultad en la adaptación de las razas y alta predisposición de contraer enfermedades. Por estas razones varios ganaderos han optado por aplicar productos químicos para combatir a las garrapatas, sin embargo el empleo excesivo de los acaricidas ha generado resistencia por parte de los parásitos hacia estos productos junto con afectaciones al medio ambiente, al animal y al ser humano (Guajardo, 2015) .

Perdidas económicas ocasionadas por las garrapatas

El impacto económico ocasionado se distribuye en pérdidas directas e indirectas. Su efecto directo involucra una disminución en la producción, daño en la piel por mordeduras, pérdidas de sangre, afectación al comportamiento y bienestar del animal (Polanco & Alberto, 2016). La pérdidas indirectas se relacionan con el costo por tratamientos clínicos, la ineficiencia en el sistema de producción, confiscación de productos como carne y leche a causa de la presencia de residuos de acaricidas, empleo de razas resistentes a los ectoparásitos pero menos productivas y la imposibilidad de emplear a los animales infestados para contribuir en la mejora genética de un rebaño (Betancur & Ríos, 2018).

Una garrapata congestionada hembra puede provocar la pérdida de hasta 1.37 g de peso corporal del ganado y una reducción de hasta 8,9 ml de leche, lo que significa una pérdida del 23% en la producción, otro efecto lo encontramos en los animales infestados quienes reducen su consumo de alimento a 4,37 kg en comparación con los no expuestos, cuyo valor es de 5,66 kg, provocando pérdidas importantes en la economía ganadera mundial (Jonsson, 2006; R. I. Rodríguez et al., 2014).

R. microplus ocasiona pérdidas calculadas en 13.9 - 18.7 mil millones de dólares por año en todo el mundo. En países como Colombia las pérdidas por año son de aproximadamente 168 millones de dólares, Brasil presenta un estimado de 3.24 mil millones en pérdidas y México indica un valor de 573.61 millones (Betancur & Ríos, 2018).

En el Ecuador, más del 75% de ganado vacuno se encuentra en zonas infestadas o con potencial de infestación por garrapatas pero no se tiene establecido un valor aproximado total, sin embargo se conoce que la pérdida financiera se determina por la pérdida de producción más el costo de control, según la FAO (2008), este valor total promedio es de USD \$ 7.3 por animal por año.

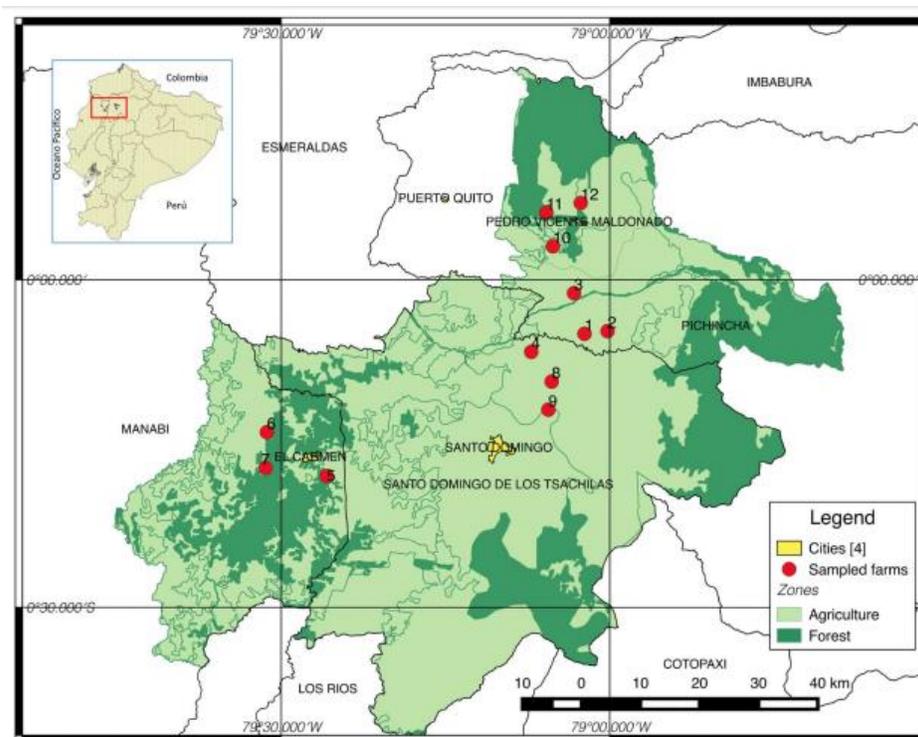
Especies de garrapatas identificadas en el Ecuador

El Ecuador es un país tropical con condiciones climatológicas que genera un ambiente ideal para el desarrollo de las garrapatas (Figura 1), sin embargo, debido a que varias zonas no han sido muestreadas no se conoce el número de especies exactas. Muñoz (2013) identificó en el ganado bovino la presencia de *R. Microplus* en un 97,53%, *Amblyomma* en un 2,25% e *Ixodes* en un 0,21% en la parroquia San José de Allurquin en la provincia de Santo Domingo de los Tsachilas. Bolaños (2016) realizó un estudio en la provincia de Los Rios, donde evidenció la presencia de *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma maculatum* y *Rhipicephalus microplus*. En 2014 Rodríguez & Bustillos identifican a *R. microplus* como la única especie que afecta al ganado

bovino en el cantón San Miguel de los Bancos provincia de Pichincha (R. Rodríguez & Bustillos, 2014).

Figura 1

Fincas en zona costera ecuatoriana con presencia de garrapatas en ganado bovino



Nota: Fincas con temperaturas en el rango de 15 y 35°C y una altitud de 500 a 1.500 msnm
 Recuperado de MAGAP (2017) <http://geoportal.sigtierras.gob.ec:8080/GeoserverViewer/>.

En el Ecuador existen más de 40 especies pertenecientes a los géneros *Amblyomma spp.*, *Dermacentor spp.*, *Haemaphysalis spp.*, *Ixodes spp.*, *Rhipicephalus spp.*, (Tabla 2), documentadas por ser relevantes veterinaria y medicamento (M. G. Estrada, 2018; Pesquera, Portillo, Palomar, & Oteo, 2015).

Tabla 2

Garrapatas identificadas en el Ecuador

Familia	Especie
Argasidae	<i>Argas magnus</i>
	<i>Argas transversus</i>
	<i>Ornithodoros capensis</i>
	<i>Ornithodoros darwini</i>
	<i>Ornithodoros furcosus</i>
	<i>Ornithodoros galapagensis</i>
	<i>Ornithodoros rudis</i>
	<i>Ornithodoros talaje</i>
Ixodidae	<i>Ornithodoros yunkerii</i>
	<i>Antricola sp.</i>
	<i>Amblyomma boulengeri</i>
	<i>Amblyomma cajennense</i>
	<i>Amblyomma calcaratum</i>
	<i>Amblyomma coelebs</i>
	<i>Amblyomma darwini</i>
	<i>Amblyomma dissimile</i>
	<i>Amblyomma hirtum</i>
	<i>Amblyomma humerale</i>
<i>Amblyomma incisum</i>	
<i>Amblyomma latepunctatum</i>	

Familia	Especie
Ixodidae	<i>Amblyomma longirostre</i>
	<i>Amblyomma macfarlandi</i>
	<i>Amblyomma maculatum</i>
	<i>Amblyomma multipunctum</i>
	<i>Amblyomma naponense</i>
	<i>Amblyomma ovale</i>
	<i>Amblyomma triste</i>
	<i>Amblyomma usingeri</i>
	<i>Amblyomma nitens</i>
	<i>Amblyomma varium</i>
	<i>Amblyomma williams</i>
	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>
	<i>Ixodes affinis</i>
	<i>Ixodes auritulus</i>
	<i>Ixodes boliviensis</i>
	<i>Ixodes cornuae</i>
	<i>Ixodes fossulatus</i>
	<i>Ixodes galapagoensis</i>
<i>Ixodes luciae</i>	
<i>Ixodes montoyanus</i>	
<i>Ixodes pomerantzi</i>	
<i>Rhipicephalus microplus</i>	

Métodos de control químico de garrapatas

Los métodos químicos tienen como función romper el ciclo de vida de las garrapatas mediante la aplicación de ixodicidas a intervalos y dosis determinadas dependiendo de la región ecológica a la cuál se aplique, la eficacia residual y la especie a combatir (Fernández Tondelli, 2006).

A nivel mundial el método químico es el más empleado, actualmente existen una amplia gama de químicos que se agrupan en familias con similitudes en su estructura química y sitio de acción; se pueden mencionar a organofosforados, amitraz, piretroides sintéticos e inhibidores de quitina, estos son aplicados en forma sistémica, es decir por inyección o de forma externa, por aspersión o inmersión (R. I. Rodríguez et al., 2014).

Poblaciones multiresistentes revelan un complejo problema, la resistencia múltiple a los pesticidas continúa extendiéndose por la presión ejercida en el empleo de garrapaticidas, actualmente las garrapatas presentan resistencia a organofosforados, piretroides y amidinas (Rosario, 2010).

Métodos de control biológico de garrapatas

Investigaciones con el objetivo de reducir la abundancia de garrapatas, han identificado varios tipos de organismos con el potencial de ser controladores biológicos, como los nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditidae* y *Steinernematidae*), hormigas reguladoras y avispas parasitoides las cuales muestran potencial al ser liberadas en abundancia, afectando principalmente al estadio libre de las garrapatas.

Los hongos entomopatógenos son probablemente la alternativa más prometedora en la reducción de varias especies de garrapatas (Ostfeld, Price, Hornbostel, Benjamin, & Keesing,

2006; Samish, Ginsberg, & Glazer, 2004). Pueden estar presentes de forma natural o pueden introducirse en el ambiente que se requiera (Rosario-Cruz et al., 2009). La efectividad en campo empleando este controlador podría mejorarse mediante la identificación de cepas altamente letales, la aplicación directa de esporas de hongos hacia las garrapatas y la optimización de dosis, medios de entrega y tiempo adecuado para realizar el despliegue hacia el ambiente (R. I. Rodríguez et al., 2014).

Generalidades de *Metarhizium anisopliae*. *M. anisopliae* es un hongo deuteromiceto que pertenece a la familia Moniliaceae, se puede adaptar a diversas condiciones climáticas y es un agente patógeno para más de 200 especies de insectos (Bahense, Fernandes, Angelo, Perinotto, & Bittencourt, 2007).

Este hongo entomopatógeno es ampliamente utilizado en la agricultura, y en los últimos años en el ganado bovino, pues varios estudios han demostrado su efectividad sobre la garrapata *R. microplus* (Suquilanda, 2017).

En el proceso de infección las esporas de *M. anisopliae* germinan y penetran la cutícula del insecto, creciendo dentro del individuo infectado, lo que genera su muerte. Este hongo produce dos toxinas, las destruxinas paralizan al insecto, mientras que las citocalacinas, inhiben su respuesta inmune (Bazán, 2002).

Generalidades de *Beauveria bassiana*. Este hongo deuteromiceto pertenece a la familia Moniliaceae, distribuido ampliamente en suelos, plantas y restos de insectos, es ampliamente empleado como biocontrolador de plagas, su mecanismo de acción es adherirse al insecto, germinar, penetrar y esporular. La beauverina es la toxina que provoca la permeabilidad de la membrana en los insectos causando su muerte. En el insecto infectado se observan síntomas como pérdida del apetito, hinchazón, parálisis muerte y momificación (Suquilanda, 2017).

En los últimos años se ha empleado este hongo entomopatógeno en ganado bovino

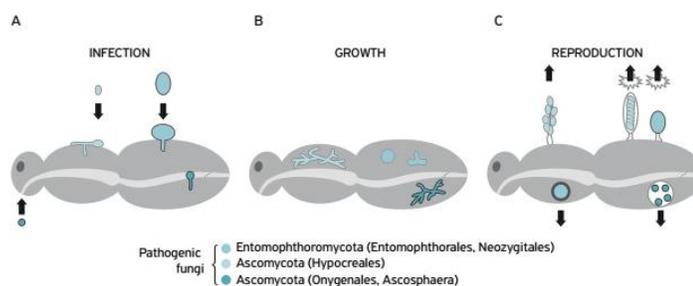
pues a nivel de laboratorio, se ha observado que en proceso de infección, *B. bassiana* produce enzimas como proteasas y quitinasas las cuales degradan la cutícula de la garrapata siendo una potencial alternativa para la disminución del uso de químicos (Suquilanda, 2017).

Proceso de infección

Para que la transmisión sea exitosa, en primera instancia se requiere de una liberación masiva de esporas y la adhesión de las mismas en la cutícula del huésped, en segundo lugar, la germinación de las esporas y la penetración del exoesqueleto del insecto, o en su defecto la sobrevivencia a la digestión tras una absorción oral, en tercer lugar, la proliferación de las células fúngicas en el hemocele, músculos y tejidos del cuerpo del hospedero, lo que ocasionará un colapso en su sistema inmunológico y su muerte y en cuarto lugar la dispersión de nuevas esporas (Figura 4) (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013).

Figura 2

Infección por hongos entomopatógenos a huéspedes artrópodos



Nota: (A) Infección: Infección de hongos entomopatógenos por conidios que penetran en la cutícula del hospedero. (B) Crecimiento: proliferación de los hongos, mediante el crecimiento de hifas o protoplastos. (C) Reproducción: liberación de conidios al ambiente.

Adhesión. El primer paso es la unión de propágulos de hongos a la cutícula del huésped, las esporas pueden llegar por contacto directo entre cadáveres infecciosos, por el aire o depositadas sobre la vegetación o animal (Mora, Castilho, & Fraga, 2018). Los hongos son heterótrofos, y absorben compuestos orgánicos producidos por los organismos huéspedes. El hongo sintetiza moléculas denominadas adhesinas, las cuales se localizan en la superficie de los conidios, estas confieren propiedades adherentes a la cutícula de los insectos hospederos (Inglis, Goettel, Butt, & Strasser, 2001).

En el proceso de adhesión se presentan tres fases: Adsorción de la spora a la superficie del insecto, por el reconocimiento de receptores de glicoproteínas específicas en el hospedero, la adhesión entre las esporas pre germinadas a la capa más externa de la cutícula y la germinación y desarrollo hasta la formación del apresorio (modificación del hifa, de manera afilada) para iniciar con la penetración (Hesketh, Roy, Eilenberg, Pell, & Hails, 2010).

Penetración. Una infección exitosa, requiere la penetración del hongo a la cutícula del insecto, la cuál se puede dar por presión mecánica y por producción de enzimas (proteasas, lipasas, quitinasas, entre otras) que degraden la cutícula del insecto y liberen nutrientes al hongo (Fan et al., 2007).

Existen propiedades de la cutícula como grosor, esclerotización y presencia de sustancias antifúngicas que intervienen en la manera en la que un hongo penetra al insecto hospedero. En el caso de *Metarhizium anisopliae*, genera una enzima llamada proteasa PR1, un factor de virulencia el cual reduce el tiempo de muerte de insectos en un 25%. Por otro lado *Beauveria bassiana* codifica la sobreexpresión de quitinasa, acelerando el proceso de muerte en un 23% (Inglis et al., 2001).

Los insectos son invadidos por hongos entomopatógenos por áreas cuticulares y membranas intersegmentarias, así como por espiráculos y órganos sensoriales. Las esporas puedan germinar en el tracto digestivo y aunque los fluidos digestivos pueden degradarlas, en ciertos casos, la digestión de los hongos puede causar muerte por toxicidad, antes que por micosis (Téllez, Cruz, Mercado, Torres, & Cuenca, 2009).

Replicación. Tras la penetración, los hongos transicionan de micelio a levadura, o en otras palabras no forman pared celular y se desarrollan protoplastos, esto debido a que adquiriendo esta transformación pueden evitar el reconocimiento por hemocitos circulantes en el hemocele. Por lo tanto, al adquirir esta forma existe un incremento en la adquisición de nutrientes, así como en la multiplicación de las células fúngicas, ya que no son detectadas por el sistema inmunológico del insecto infectado (Inglis, Goettel, Butt, & Strasser, 2001).

Otros de los mecanismos que emplean los hongos es la síntesis de proteasas, quienes atacan el sistema inmunológico humoral, así como la liberación de destruxinas las cuales paralizan al insecto, ya que inhiben su síntesis de ADN, ARN y la síntesis de otras toxinas que afectan al sistema muscular y túbulos de Malpighi, afectando su capacidad de alimentarse, excreción y movimiento. El insecto responde a la infección por mecanismos humorales (lectinas, proteínas y péptidos de defensa) así como mecanismos celulares (fagocitosis, encapsulación). Una vez las fuentes de nitrógeno del insecto se agotan, la levadura retorna a su estado micelial. Una vez las condiciones de humedad y temperatura sean favorables, las hifas atravesaran el tegumento del cadáver del insecto y el hongo saldrá al medio ambiente. En este momento las condiciones ambientales controlaran la producción, supervivencia y germinación de conidios (Téllez et al., 2009).

Hipótesis

Los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* tienen capacidad acaricida significativa frente al estadio adulto de la garrapata *Rhipicephalus microplus*

Capítulo 2: Materiales y Métodos

Participantes

La presente investigación fue desarrollada por Jemmy Daniela Tipás Viteri, con el apoyo de la empresa Yura Biosearch.

Zona de estudio

El proyecto de investigación consta de dos fases; una fase de campo y una fase de laboratorio.

Trabajo de laboratorio

El trabajo de investigación del efecto acaricida de los hongos entomopatógenos sobre *R. microplus* se realizó en los Laboratorios de la empresa Yura Biosearch, ubicada en la Armenia II, Charles Darwin y Quintillano Sánchez, a una altura de 2,443 m.s.n.m. con coordenadas geográficas correspondientes a 0°17'08"S y 78°27'49"O.

La identificación morfológica de las garrapatas se llevó a cabo en los Laboratorios del Instituto de Investigación en Zoonosis (CIZ), de la Universidad Central del Ecuador, ubicado en el centro-norte de la ciudad de Quito a una altura de 2,861 m.s.n.m. con coordenadas geográficas correspondientes a 0°11'22"S y 78°30'04"O. En la Ciudadela Universitaria Av. América.

Trabajo de campo

La recolección de las garrapatas se realizó en la finca "La Maminita" ubicada en la parroquia San Miguel de los Bancos, cantón San Miguel de los Bancos, provincia de Pichincha, sus condiciones meteorológicas son, temperatura media anual 22°C, precipitación media anual

3494 mm/año, humedad media atmosférica de 91% a 94%, longitud 0 00' 32,1", latitud 00' 03,2", altitud 777 m.s.n.m.

Período de investigación

La investigación se inició en febrero del 2020 y finalizó en agosto del 2020.

Comprendiendo 6 meses de investigación.

Recolección de garrapatas

Se tomaron muestras al azar de garrapatas que se encontraban sobre las ubres, abdomen, rabo, cuello y orejas de cuatro bovinos parasitados naturalmente y sin aplicación de pesticidas por más de 60 días, según el método descrito por Alvarado & Dixon, (2010).

Empleando una pinza las garrapatas se desprendieron contrario al pelo del animal hospedador empleando suaves movimientos de torsión evitando la ruptura del capítulo, las garrapatas se clasificaron en tres grupos.

Para el primer grupo que fue destinado a la identificación de la especie, se recolectaron 40 ejemplares, entre machos y hembras no ingurgitadas y se colocaron en 1 tubo Falcon con etanol al 70%, posteriormente fueron conservadas a temperatura ambiente hasta su análisis morfológico.

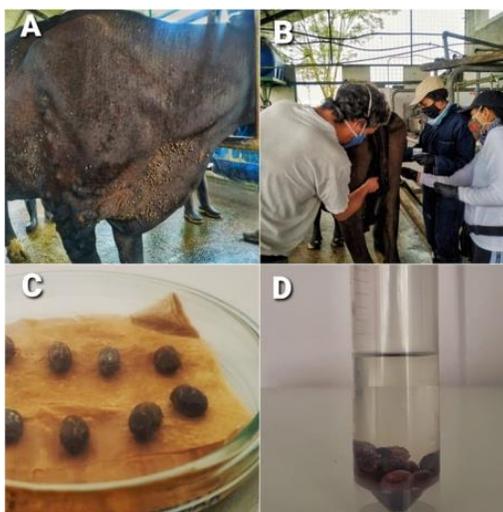
El segundo grupo se conformó por 400 garrapatas adultas (machos y hembras ingurgitadas) destinadas a la evaluación de la efectividad de los productos a base de hongos entomopatógenos.

El tercer grupo con 10 ejemplares (machos y hembras no ingurgitadas) se destinó a la reactivación de los hongos, los ectoparásitos del grupo dos y tres se colocaron en cámaras húmedas, formadas por cajas Petri con papel absorbente estéril, humedecido con agua destilada

y se sellaron con parafilm para ser transportadas en un contenedor térmico (Figura 3). Los tres grupos de garrapatas se llevaron al laboratorio de Yura Biosearch.

Figura 3

Recolección de garrapatas



Nota: (A) Ganado parasitado naturalmente de la finca “La Maminita”. (B) Recolección de garrapatas del ganado empleando una pinza y movimientos de torsión. (C) Garrapatas en cámara húmeda destinadas a reactivación y evaluación del efecto acaricida de los hongos. (D) Garrapatas en etanol al 70% destinadas a la identificación de especie.

Identificación morfológica de garrapatas

Para la identificación morfológica, las garrapatas se limpiaron superficialmente con un pincel y se colocaron bajo un estereoscopio Nikon SMZ 745T, empleando una clave dicotómica para la identificación de garrapatas (Labruna, n.d.).

Clave para la identificación de los géneros de garrapatas adultas en el Ecuador

1A. Surco anal marcado. Ausencia de festones y ojos y un escudo sin adornos (*Ixodes*)

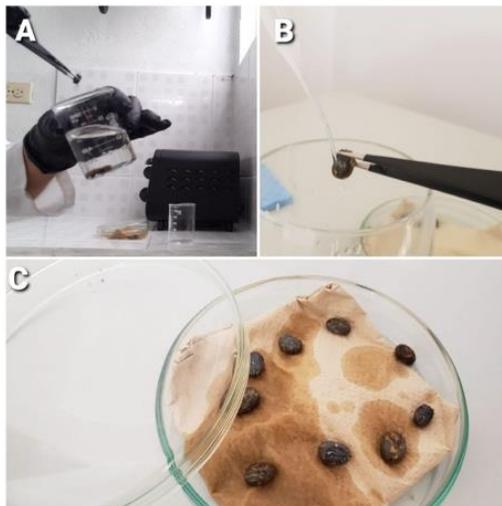
- 1B. Surco anal post anal ausente (2A,2B)
 - 2A. Gnatossoma largo, escudo con o sin presencia de adornos (*Amblyomma*)
 - 2B. Gnatossoma corto, escudo con ausencia de adornos (3A,3B)
 - 3A. Base del capítulo con forma rectangular (4A,4B)
 - 3B. Base del capítulo con forma hexagonal (5A,5B)
 - 4A. Ausencia de ojos, presencia de 11 festones (*Haemaphysalis*)
 - 4B. Presencia de ojos, 7 festones y peritrema con forma de disco (*Dermacentor nitens*)
 - 5A. Gnatossoma largo (más largo que ancho), palpos del mismo tamaño que el hipostoma, coxa I con dos espolones largos, presencia de festones, machos presentan 2 placas adanales (*Rhipicephalus sanguineus*)
 - 5B. Gnatossoma corto (largo igual al ancho), palpos más cortos que el hipostoma, coxa I con dos espolones muy pequeños, ausencia de festones y los machos presentan 4 placas adanales (*Rhipicephalus microplus*)
- (Labruna, n.d.)

Obtención de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*

Las cepas de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* fueron proporcionadas por el Laboratorio de la empresa Yura Biosearch, los cuales se comercializan bajo los nombres comerciales Betaprot y Methaprot respectivamente.

Reactivación de hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*

Utilizando la metodología empleada por Yura Biosearch, se desinfectaron 10 garrapatas (machos y hembras no ingurgitadas en estado adulto) con hipoclorito de sodio al 0,5% sumergiéndolos en la solución por 10 minutos, posteriormente fueron lavadas tres veces con agua destilada y se retiró el exceso con una toalla de papel estéril (Figura 4).

Figura 4*Limpieza y desinfección de garrapatas*

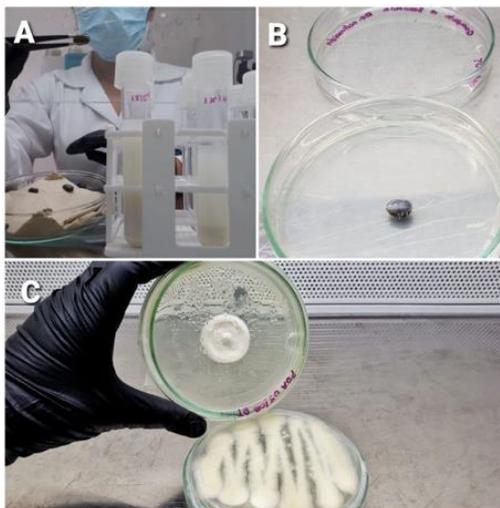
Nota: (A) Garrapatas sumergidas por 10 minutos en hipoclorito de sodio al 0.5% por 10 minutos. (B) Lavado de garrapatas con agua destilada estéril. (C) Ectoparásitos colocados en papel toalla estéril para retirar el exceso de agua.

A continuación 5 garrapatas ya desinfectadas se colocaron en un tubo de 10 ml que contenían el producto a base de *Beauveria bassiana*, de igual manera, en otro tubo que contenía 10 ml de la formulación a base de *Metarhizium anisopliae* se colocaron 5 garrapatas previamente desinfectadas, estas inmersiones se llevaron a cabo por 2 minutos. Sin retirar el exceso, los ectoparásitos se colocaron en dos placas Petri con papel toalla estéril humedecida con agua destilada, generando una cámara húmeda. Las placas fueron llevadas a incubar por 10 días a $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

Los ectoparásitos colonizados por los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, se desinfectaron por 1 minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 5%, para la conservación de las cepas de hongos, estas garrapatas fueron colocadas en el medio de cultivo PDA (Figura 5).

Figura 5

Reactivación y conservación de cepas B. bassiana y M. anisopliae



Nota: (A) Garrapatas colocadas en 10 ml de una solución formada por los hongos entomopatógenos. (B) Insecto colonizado y desinfectado en agar PDA. (C) Cepas destinadas a preparar el producto para la evaluación del efecto acaricida.

Preparación y control de calidad del inóculo

Posteriormente se realizó la preparación de los inóculos utilizando los hongos reactivados y conservados en el medio PDA según el protocolo de la empresa Yura Biosearch, así como un control de calidad de los hongos reactivados, para lo cual se determinaron concentraciones de esporas por mililitro, porcentaje de germinación y pureza. Se prepararon cuatro concentraciones a partir de conidias puras de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, más un grupo testigo que únicamente tenía agua destilada estéril.

Determinación de la concentración de esporas (conidios)

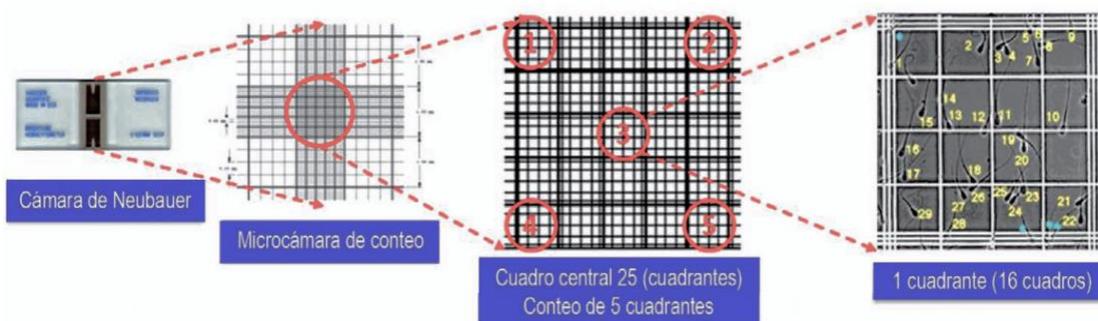
Tanto para el inóculo formado por *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, se realizaron 4 diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Se tomó 10 μL de cada dilución y se

colocó sobre la cámara de Neubauer, se cubrió con un cubreobjetos y se dejó reposar por 30 segundos antes de iniciar con el conteo, la lectura se realizó con el objetivo 40x. se efectuó por duplicado el conteo de esporas en los 5 cuadrantes centrales de la cámara de Neubauer.

La cámara de Neubauer es una lámina de vidrio con dos cámaras de 0,1 mm de profundidad, cada cámara se divide nueve cuadrados de 1 mm^2 . El cuadrado central se subdivide en 25 cuadrados de 0,2 mm. Los cuadrados centrales se subdividen en 16 cuadrados más pequeños de $0,0025 \text{ mm}^2$ cada uno (Figura 6). Para el conteo se emplearon 5 de los cuadrados centrales y se procedió con el conteo de las esporas por duplicado (Tabla 3).

Figura 6

Metodología de conteo de células en cámara de Neubauer



Nota: Se describe el procedimiento que se efectuará para el conteo en cámara de Neubauer de las esporas (conidias) de hongos entomopatógenos. Tomado de Cultivo de tejidos reproductivos y producción y manipulación de embriones bovinos, 2014, Fondo Editorial Biogénesis.

Tabla 3

Conteo de esporas (conidios) de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae mediante cámara de Neubauer

Dilución	Repetición	<i>Beauveria bassiana</i>					<i>Metarhizium anisopliae</i>				
		Cuadrantes					Cuadrantes				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1×10^{-1}	R1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	R2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
1×10^{-2}	R1	103	100	99	102	101	105	100	98	103	102
	R2	105	89	103	101	100	104	93	102	101	98
1×10^{-3}	R1	11	8	10	12	11	11	9	10	12	12
	R2	11	9	9	12	8	11	12	10	13	8
1×10^{-4}	R1	1	2	1	2	1	2	3	1	1	1
	R2	3	3	1	1	1	2	2	1	2	1

Nota: NC=No Conteo. La dilución 1×10^{-1} en los conteos por duplicado, presento una alta cantidad de esporas, por lo que no fue posible realizar su enumeración, las siguientes diluciones seriadas, muestran una cantidad de esporas correspondientes a su concentración.

Finalmente se aplicó la fórmula: $C = N * FD^{-1} * FC$, donde C= concentración de esporas por mililitro, N es el número de esporas contabilizadas en los 25 cuadrantes contenidos en el cuadro central de la cámara, FD es el factor de dilución, FC es el factor de corrección, el cuál corresponde a 10000. Las concentraciones empleadas en la evaluación del efecto acaricida tanto para *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, se encuentran resumidas en la siguiente tabla, junto con el código que se utilizará en el análisis estadístico.

Tabla 4

Concentraciones de los hongos entomopatógenos B. bassiana y M. anisopliae empleadas en la evaluación del efecto acaricida en el control de la garrapata R. microplus

Código	Concentración del hongo
B1	1,6x10 ⁵ esporas/ml
B2	1,01x10 ⁶ esporas/ml
B3	1,003x10 ⁷ esporas/ml
B4	1,003x10 ⁸ esporas/ml

Determinación del porcentaje de germinación

El porcentaje de germinación fue evaluado para *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Se sembró 0,1 ml de una dilución que contenía aproximadamente 1x10⁴ esporas del producto a evaluar en AA (agar-agua) en tres sitios de la caja Petri previamente marcados al reverso, se dispersó la muestra sobre la línea guía, las cuáles tenían al menos 1 cm de separación de cada una, se sembraron dos cajas por cada tiempo de evaluación (12h, 18h, 24h). Se incubaron las cajas Petri a 27 °C, transcurrido el tiempo se retiró con una espátula una porción del agar ubicado sobre la línea trazada y se colocó en un portaobjetos. Se adicionó una gota de azul de lactofenol y se colocó un cubreobjetos, finalmente se observó bajo un microscopio.

Se realizaron 6 lecturas por hongo entomopatógeno de 200 conidios o esporas germinados o no germinados (Anexo 3). Se consideró que un conidio germinado es aquel que ha emitido un tubo germinativo del mismo o mayor tamaño a la espora. Se registró el % de germinación en el tiempo de incubación (Tabla 5), empleando los valores del anexo 3 en la siguiente ecuación:

$$\text{Germinación(\%)} = \frac{\text{conidios o esporas germinadas}}{\text{Total de conidios o esporas contados}} * 100$$

Tabla 5

Porcentaje de germinación de inóculos formados por M. anisopliae y B. bassiana

Hongo entomopatógeno	% germinación		
	12 horas	18 horas	24 horas
<i>Beauveria bassiana</i>	58	82,67	91,33
<i>Metarhizium anisopliae</i>	68	89,91	97,83

Determinación del porcentaje de pureza

Se sembraron los inóculos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en los medios PDA, SDA y AN, se incubaron a 24°C por 3 días y se procedió a realizar el conteo de hongos contaminantes, bacterias aerobias mesófilas contaminantes y levaduras contaminantes, que estuvieron presentes en 6 ensayos de determinación de pureza por hongo entomopatógeno (Anexo 12).

Para el cálculo del porcentaje de pureza de cada hongo (Tabla 6), se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{A}{A+B+C+D} * 100$$

Donde:

A= Concentración de ingrediente activo aislado

B= Concentración de hongos contaminantes

C= Concentración de bacterias aeróbicas mesófilas contaminantes

D= Concentración de levaduras contaminantes

Tabla 6

Porcentaje de pureza de inóculos formados por M. anisopliae y B. bassiana

Hongo entomopatógeno	Repetición	% Pureza
<i>Beauveria bassiana</i>	R1	99, 967
<i>Metarhizium anisopliae</i>	R1	99, 842

Inoculación

Una vez que obtuvimos los parámetros de calidad de los inóculos formados, siguiendo la metodología descrita por Monzón (2001), colocamos 10 garrapatas adultas por 1 minuto en tubo con hipoclorito de sodio al 0,5%, se empleo esta concentración en este tiempo por ser la recomendada para organismos vivos, posteriormente se lavaron por tres ocasiones con agua destilada y se retiró el exceso en un papel toalla estéril. A continuación, se colocaron las garrapatas en un tubo de ensayo el cual se rellenó con el inóculo formado por el hongo a evaluar durante 10 minutos, pasado este tiempo se vació el inóculo, las garrapatas se colocaron en cámaras húmedas, 10 por cada cámara, finalmente se sellaron con parafilm para mantener la humedad y se colocaron en la incubadora a 27°C (Tabla 7).

Tabla 7

Análisis estadístico del ensayo de inoculación de formulaciones de B. bassiana y M. anisopliae a diferentes concentraciones en garrapatas en estado adulto.

Concentración (esporas/ml)	<i>B. bassiana</i>				<i>M. anisopliae</i>			
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4
B1: $1,6 \times 10^5$	10	10	10	10	10	10	10	10
B2: $1,01 \times 10^6$	10	10	10	10	10	10	10	10
B3: $1,003 \times 10^7$	10	10	10	10	10	10	10	10
B4: $1,003 \times 10^8$	10	10	10	10	10	10	10	10
T1: testigo	10	10	10	10	10	10	10	10

Nota: Se presenta los tipos de hongos entomopatógenos junto con las concentraciones a evaluar de cada uno, más un tratamiento testigo, el cual contiene agua destilada estéril. El

ensayo presenta cuatro réplicas, el valor 10 representa al número de ectoparásitos por caja Petri, cada garrapata se toma como unidad experimental.

Evaluación de la mortalidad

El porcentaje de mortalidad se evaluó desde el día 1 al día 19 el porcentaje de mortalidad (M), el cuál se analizará de acuerdo con Schneider y Orelli (Nakano, Silveira, & Zucchi, 1981).

$$M = \frac{\%Mortalidad\ en\ el\ tratamiento - \%Mortalidad\ en\ el\ control}{100 - \%Mortalidad\ en\ el\ tratamiento} * 100$$

Se consideró que una garrapata ha muerto por ausencia de movilidad al estereoscopio y la presencia de conidios *B. bassiana* o *M. anisopliae* en el cuerpo del ectoparásito.

Estimación concentración letal media (CL50) y tiempo letal medio (TL50) de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*

Los datos para determinar la concentración letal media (CL50) y tiempo letal medio (TL50) se analizaron utilizando el programa R Studio V1.3, empleando un modelo log-logístico con la función “drm()” del paquete “drc()”.

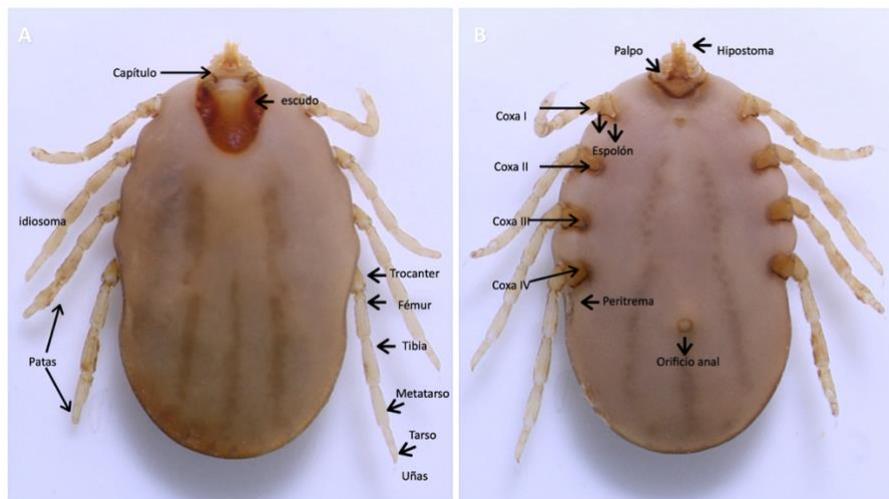
Capítulo 3: Resultados

Identificación morfológica de las garrapatas recolectadas en la finca ganadera

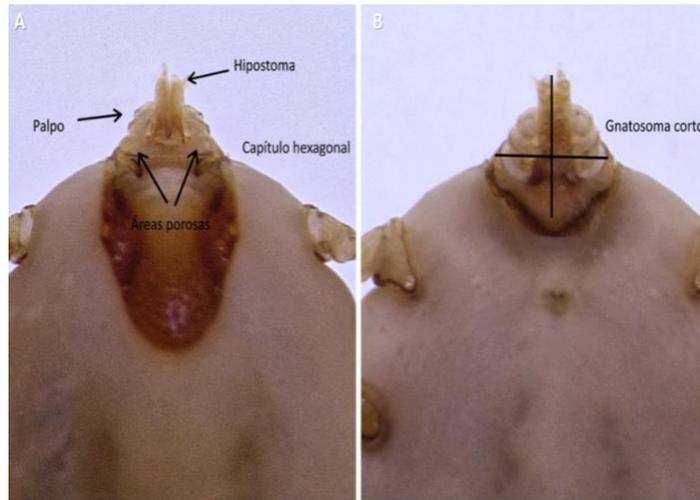
De las 40 garrapatas recolectadas se determinó que el 100% fueron identificadas como *R. microplus*. 10 garrapatas fueron reconocidas como machos en estado adulto y 40 como hembras en estado adulto. Los especímenes hembras observadas presentaron las siguientes características: surco anal post anal ausente, coxa 1 con dos espolones muy pequeños, ausencia de festones y un escudo incompleto (Figura 7), presencia de gnatosoma corto (largo igual al ancho), palpos más cortos que el hipostoma, capítulo hexagonal con presencia de áreas porosas (Figura 8).

Figura 7

Rhipicephalus microplus hembra



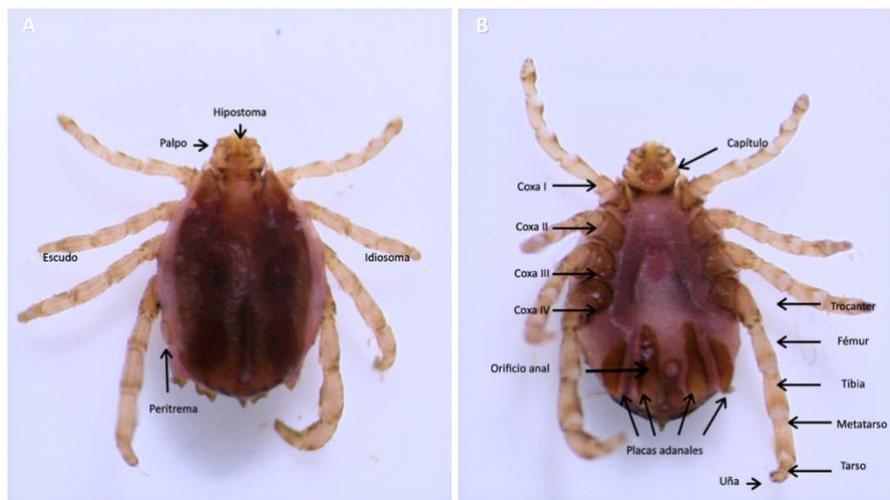
Nota: (A) Vista dorsal de *Rhipicephalus microplus* hembra. (B) Vista ventral de *Rhipicephalus microplus* hembra.

Figura 8*Gnatosoma Rhipicephalus microplus hembra*

Nota: (A) Vista dorsal del gnatosoma de *Rhipicephalus microplus* hembra, palpos más cortos que el hipostoma, áreas porosas en el capítulo que presenta forma hexagonal. (B) Vista ventral del gnatosoma de *Rhipicephalus microplus* hembra, se presenta de forma corta (largo igual al ancho).

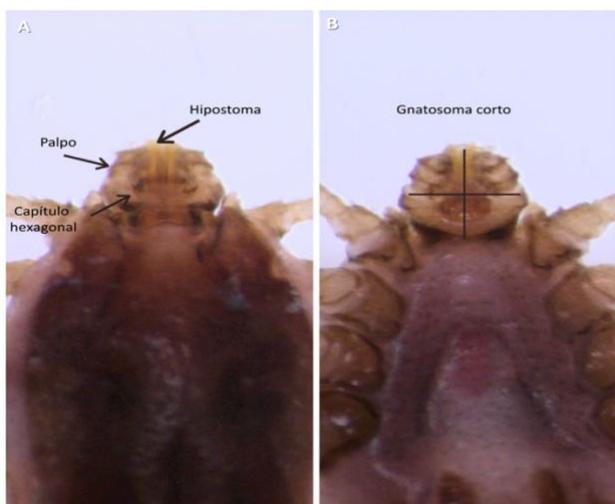
Los machos presentaron un idiosoma o cuerpo con márgenes anterolaterales de rectos a cóncavos, peritremas al costado después de la cuarta coxa, surco anal post anal ausente, coxa 1 con dos espolones muy pequeños, ausencia de festones, cuatro placas adanales visible de forma ventral y un escudo sin adorno presente en toda la superficie dorsal (Figura 9), un gnatosoma corto (largo igual al ancho), palpos más cortos que el hipostoma, capítulo hexagonal sin áreas porosas (Figura 10).

Figura 9

Rhipicephalus microplus macho

Nota: (A) Vista dorsal de *Rhipicephalus microplus* macho. (B) Vista ventral de *Rhipicephalus microplus* macho.

Figura 10

Gnatosoma Rhipicephalus microplus macho

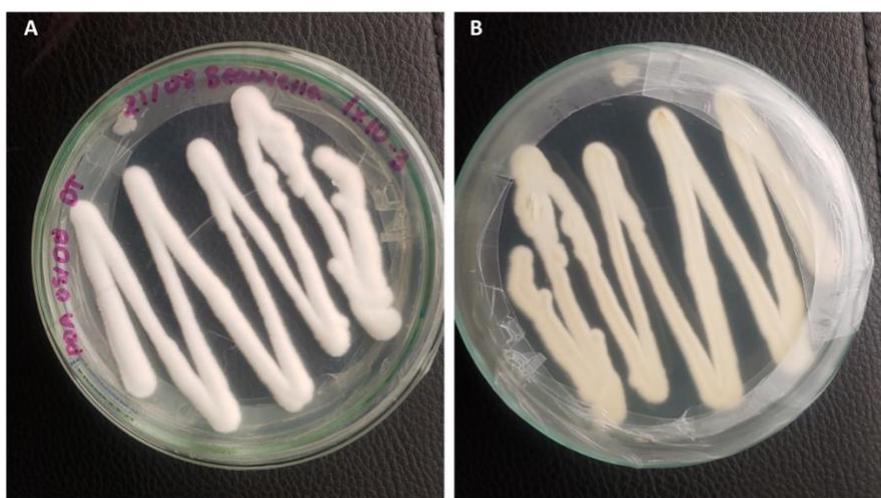
Nota: (A) Vista dorsal del gnatosoma de *Rhipicephalus microplus* macho (B) Vista ventral del gnatosoma de *Rhipicephalus microplus* macho.

Cultivos puros obtenidos y características macroscópicas

Tras reactivar la cepa de *Beauveria bassiana*, se obtuvieron cultivos puros en PDA, con las siguientes características: colonias algodonosas de color blanco polvoriento al derecho de la caja Petri, mientras que al revés presentaron un color amarillento con un tono rojizo en el centro (Figura 11).

Figura 11

Cultivos puros aislados de Beauveria bassiana

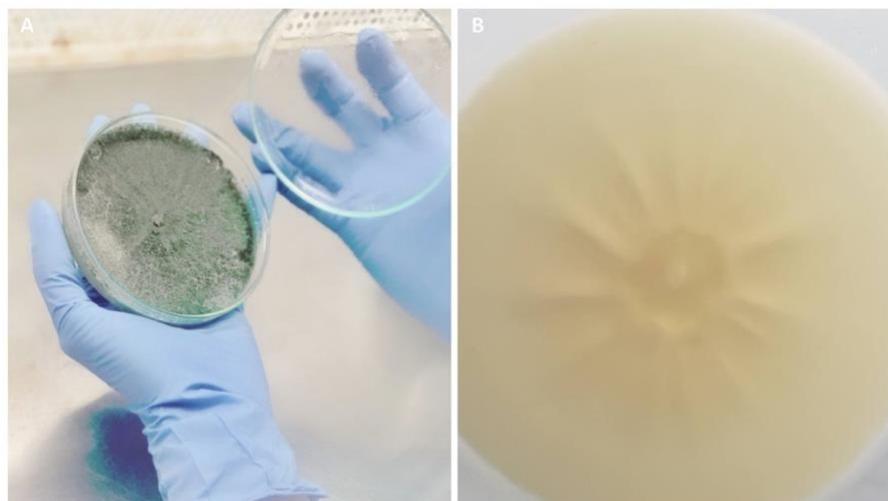


Nota: (A) Vista macroscópica de *Beauveria bassiana* observada al derecho de la caja Petri en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) y una siembra por estriado. (B) Vista macroscópica observada al revés de la caja Petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA) y siembra por estriado.

Tras reactivar la cepa de *Metarhizium anisopliae*, se obtuvieron cultivos puros en PDA, con las siguientes características: colonias algodonosas de color verde claro a verde grisáceo oscuro al derecho de la caja Petri, mientras que al envés de la caja presentaron un color amarillo pálido (Figura 12).

Figura 12

Cultivos asilados puros de Metarhizium anisopliae



Nota: (A) Vista macroscópica de *Metarhizium anisopliae* observada al derecho de la caja Petri con un crecimiento del 100% en medio Papa Dextrosa Agar (PDA). (B) Vista macroscópica de *Metarhizium anisopliae* observada al revés de la caja Petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA).

Cultivos puros obtenidos y características microscópicas

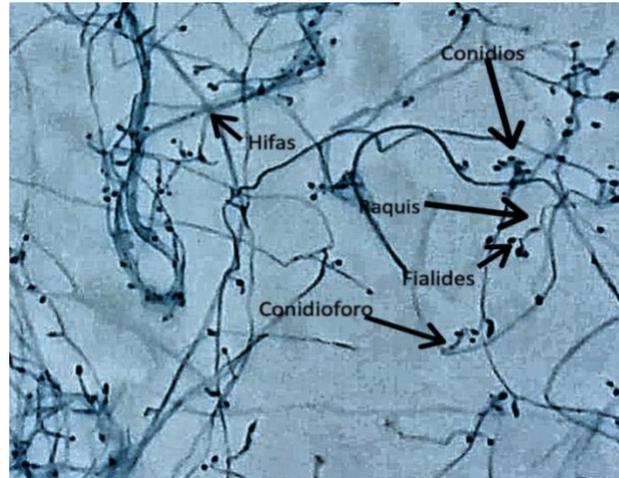
Una vez obtenidos los cultivos puros y observadas sus características macroscópicas, se tomó una muestra de colonias puras de *B. bassiana* y de *M. anisopliae*, se realizó una tinción con azul de lactofenol y se observó bajo un microscopio óptico con un objetivo 40x las siguientes características para *Beauveria bassiana*: hifas lisas, con conidios formando racimos densos e irregularmente agrupados, las fialides se hinchan en la base y se adelgazan hacia la zona donde sostienen las esporas, raquis en forma de zigzag (Figura 13).

Las colonias puras de *M. anisopliae* presentaron: conidióforo con dos a tres ramificaciones en cada septo, crecimiento de forma irregular con conidias predominantemente

cilíndricas y agrupadas. Sus hifas son lisas y septadas y sus fialides delgadas en el ápice (Figura 14).

Figura 13

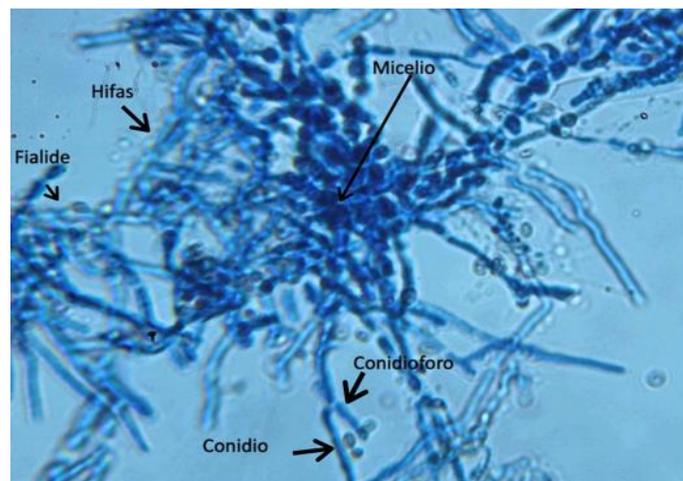
Tinción con azul de lactofenol de Beauveria bassiana



Nota: Beauveria bassiana teñida con azul de lactofenol, observada en microscopio óptico OMAX G015020170 a 40x.

Figura 14

Tinción con azul de lactofenol de Metarhizium anisopliae



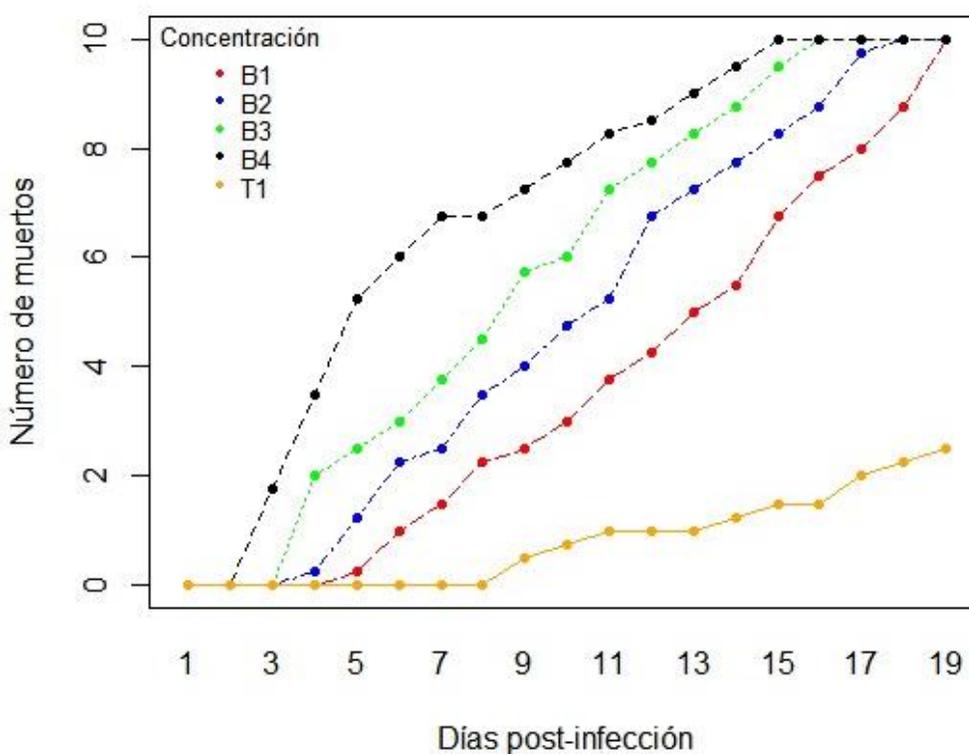
Nota: M. anisopliae, observadas con el microscopio OMAX G015020170 bajo el objetivo 100x.

Porcentaje de mortalidad de las garrapatas expuestas a *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*

Se encontró que en los cuatro tratamientos donde fue utilizado *B. bassiana* se produjo la muerte del total de las garrapatas antes de los 20 días. La concentración denominada B4= $1,003 \times 10^8$ esporas/ml obtuvo la tasa de mortalidad más alta en menor tiempo, observándose la muerte de todas las garrapatas en el día 14,5 del experimento, seguida por la concentración B3= $1,003 \times 10^7$, B2= $1,01 \times 10^6$, B1= $1,6 \times 10^5$ esporas/ml presentándose la muerte en los días, 15,5; 17,25 y 18,75 respectivamente (Figura 15).

Figura 15

Número de garrapatas R. microplus en estado adulto, muertos por acción de diferentes concentraciones de B. bassiana



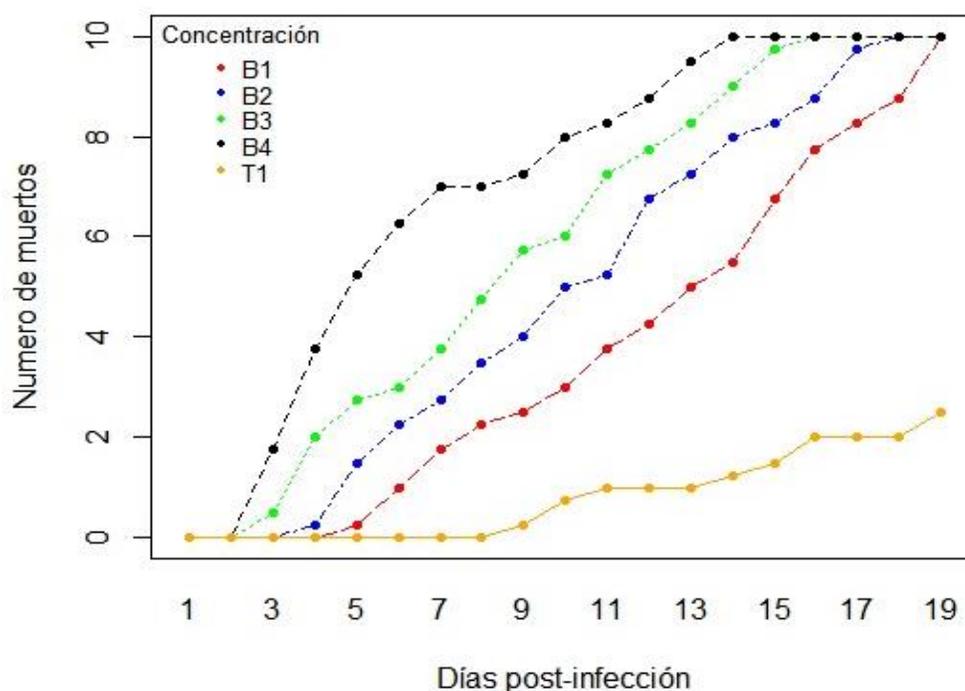
Nota: Número de muertos alcanzados en el transcurso del ensayo, a diferentes concentraciones.

B1= $1,6 \times 10^5$, B2= $1,01 \times 10^6$, B3= $1,003 \times 10^7$, B4= $1,003 \times 10^8$, T1= control

En los tratamientos de *M. anisopliae*, la concentración de $1,003 \times 10^8$ esporas/ml ocasionó la muerte del 100% de las garrapatas en el día 13,5 del experimento, seguida por la concentraciones $1,003 \times 10^7$, $1,01 \times 10^6$, $1,6 \times 10^5$ esporas/ml, produciendo la muerte de las garrapatas en los días, 15, 17,25 y 18,5 respectivamente. El inicio de las muertes varió en cada concentración y la velocidad en la que se presentó la muerte de los ectoparásitos fue mayor a medida que aumentó la concentración del hongo (Figura 16).

Figura 16

Número de garrapatas R. microplus muertas por acción de diferentes concentraciones de M. anisopliae



Nota: Se presentan gráficos del número de muertos alcanzados en el transcurso del ensayo, a diferentes concentraciones. B1= $1,6 \times 10^5$, B2= $1,01 \times 10^6$, B3= $1,003 \times 10^7$, B4= $1,003 \times 10^8$, T1=Control

Figura 17

R. microplus en estado adulto, colonizado con *B. bassiana* y *M. anisopliae*



Nota: (A) *R. microplus* a los 19 días post aplicación del inóculo a base de *B. bassiana*, se observa un idiosoma blanquecino, producto de la esporulación del hongo. (B) *R. microplus* a los 19 días post aplicación del inóculo a base de *M. anisopliae*, se observa un idiosoma verdoso, producto de la esporulación del hongo en el cuerpo del ectoparásito.

Concentración letal media (CL50) de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*

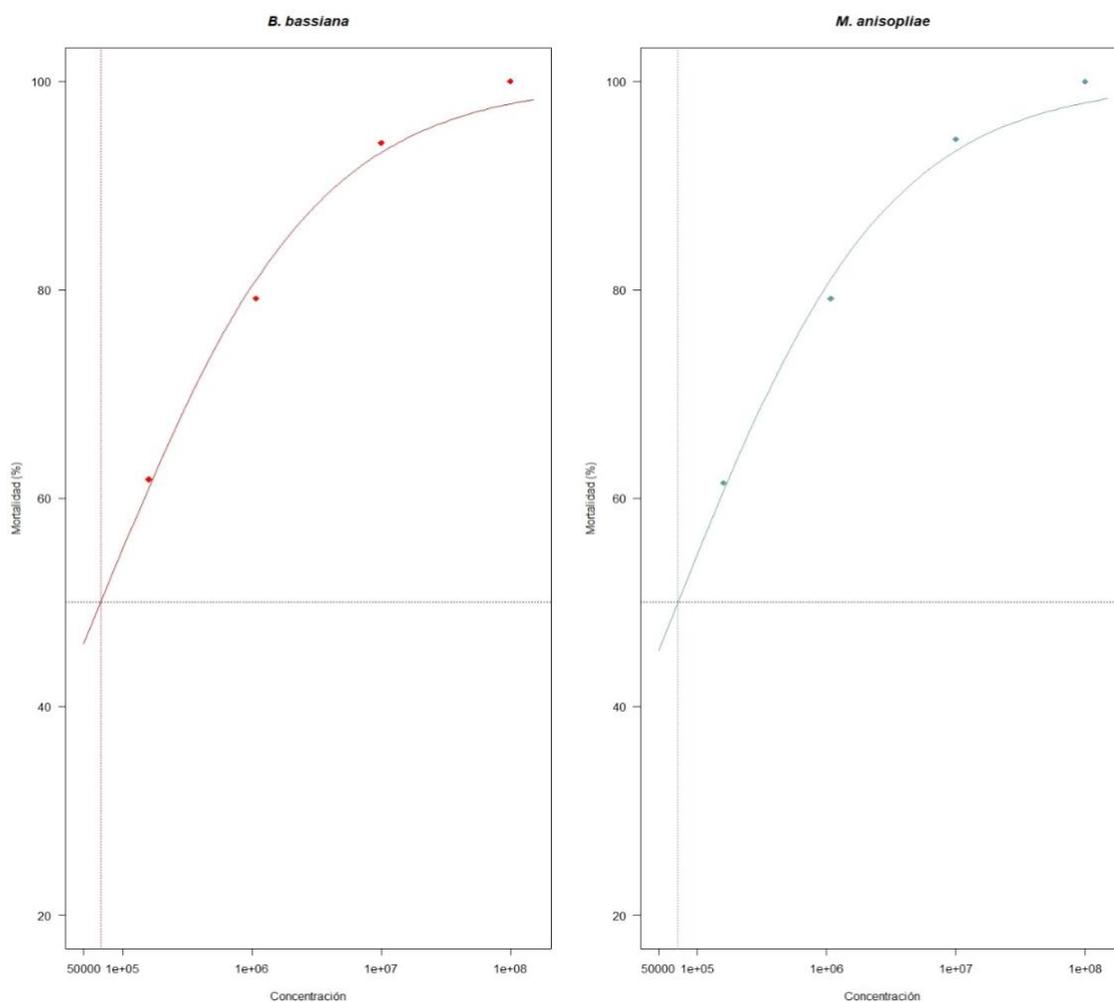
Para determinar la concentración letal media (CL50) de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre *R. microplus* en estado adulto a los 15 días de evaluación, se empleó el programa R Studio V1.3, empleando un modelo log-logístico con la función “drm()” del paquete “drc”, el análisis mostró que *B. bassiana* presentó una CL50 correspondiente a $6,7670 \times 10^4$ esporas/ml (Anexo 7).

Mientras que el hongo *M. anisopliae* mostró una CL50 de $7,06945858 \times 10^4$ esporas/ml (Anexo 8). Mostrando que las cepas de la empresa Yura Biosearch, presentaron una buena eficacia sin emplear la concentración más elevada a condiciones *in vitro*.

En la función log-logística, se puede observar la concentración ideal para obtener la mortalidad del 50% de la población de *R. microplus* por *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Figura 18). Estos resultados evidencian el efecto acaricida de estos hongos entomopatógenos, permitiendo la creación de estrategias para el control integrado de esta plaga.

Figura 18

Concentración letal media de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae



Nota: M. anisopliae mostró una CL50 de $7,06945858 \times 10^4$ esporas/ml mientras que *B. bassiana* presentó una CL50 correspondiente a $6,7670 \times 10^4$ esporas/ml

Tiempo letal medio (TL50) de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*

Al analizar las concentraciones de los hongos mediante R Studio V1.3, empleando un modelo log-logístico con la función “drm()” del paquete “drc” se observó que cada una de las concentraciones de *B. bassiana* alcanzó un TL50, en diferentes momentos del ensayo (Figura 19). La concentración $1,003 \times 10^8$ esporas/ml fue la primera en alcanzar un TL50 a los 5,38099 días de ensayo.

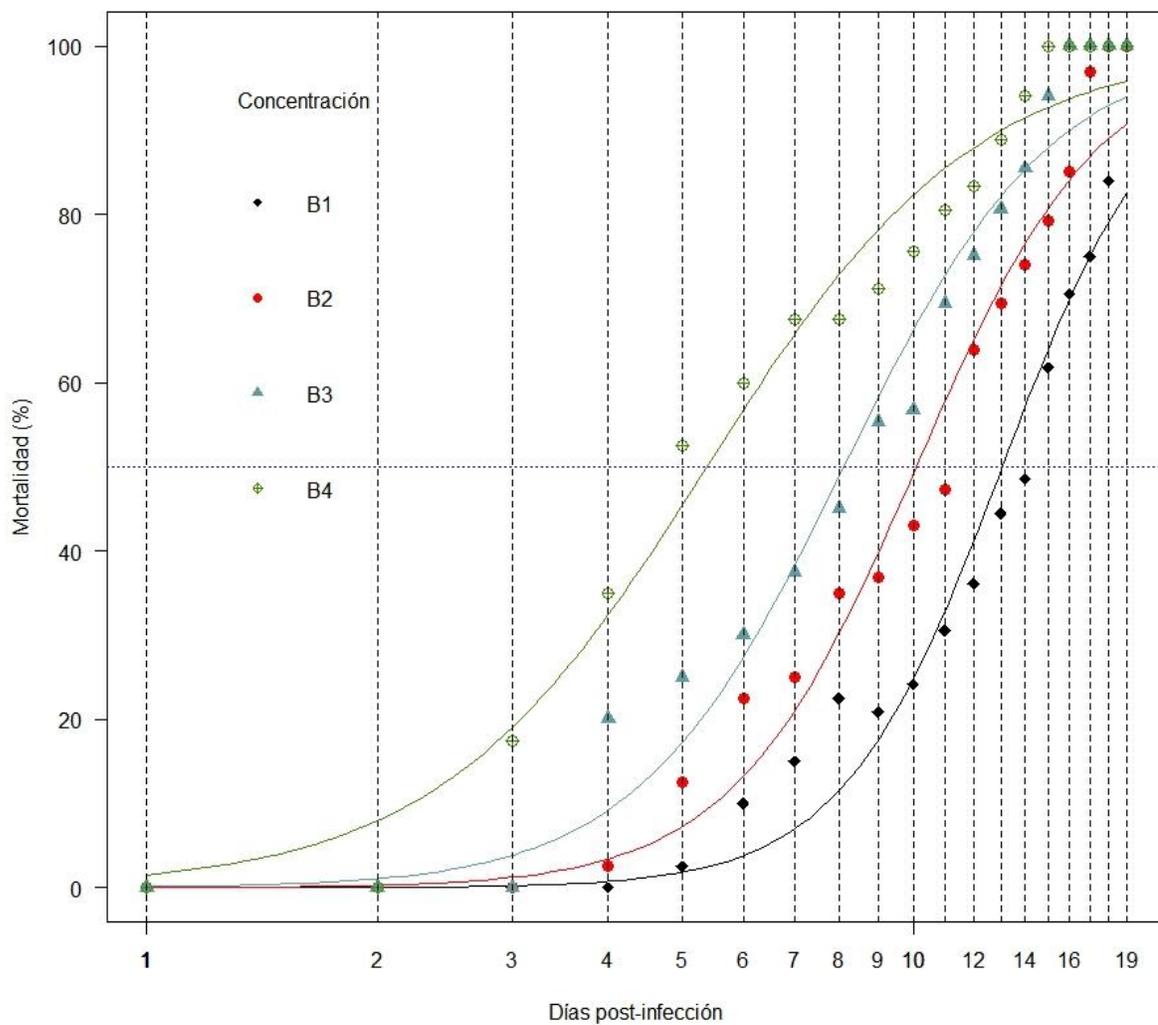
De igual forma se procedió con las concentraciones faltantes (Anexo 10), donde se observa que la concentración $1,003 \times 10^7$ esporas/ml alcanzó su TL50 a los 8.11669 días, mientras que para las concentraciones $1,01 \times 10^6$ y $1,6 \times 10^5$ esporas/ml el TL50 se obtuvo a los 10.09281 y 13.05976 días de estudio, respectivamente.

El análisis de las concentraciones del hongo entomopatógeno *M. anisopliae*. nos indica que la concentración que presentó mayor eficacia fue $1,003 \times 10^8$ esporas/ml, ya que alcanzó el TL50 a los 5,20688 días.

La siguiente concentración en alcanzar el TL50 fue $1,003 \times 10^7$ esporas/ml a los 7,96742, mientras que $1,01 \times 10^6$ y $1,6 \times 10^5$ esporas/ml quienes alcanzaron el tiempo letal medio a los 9,93436 y 12,97655 días, respectivamente (Figura 20).

Figura 19

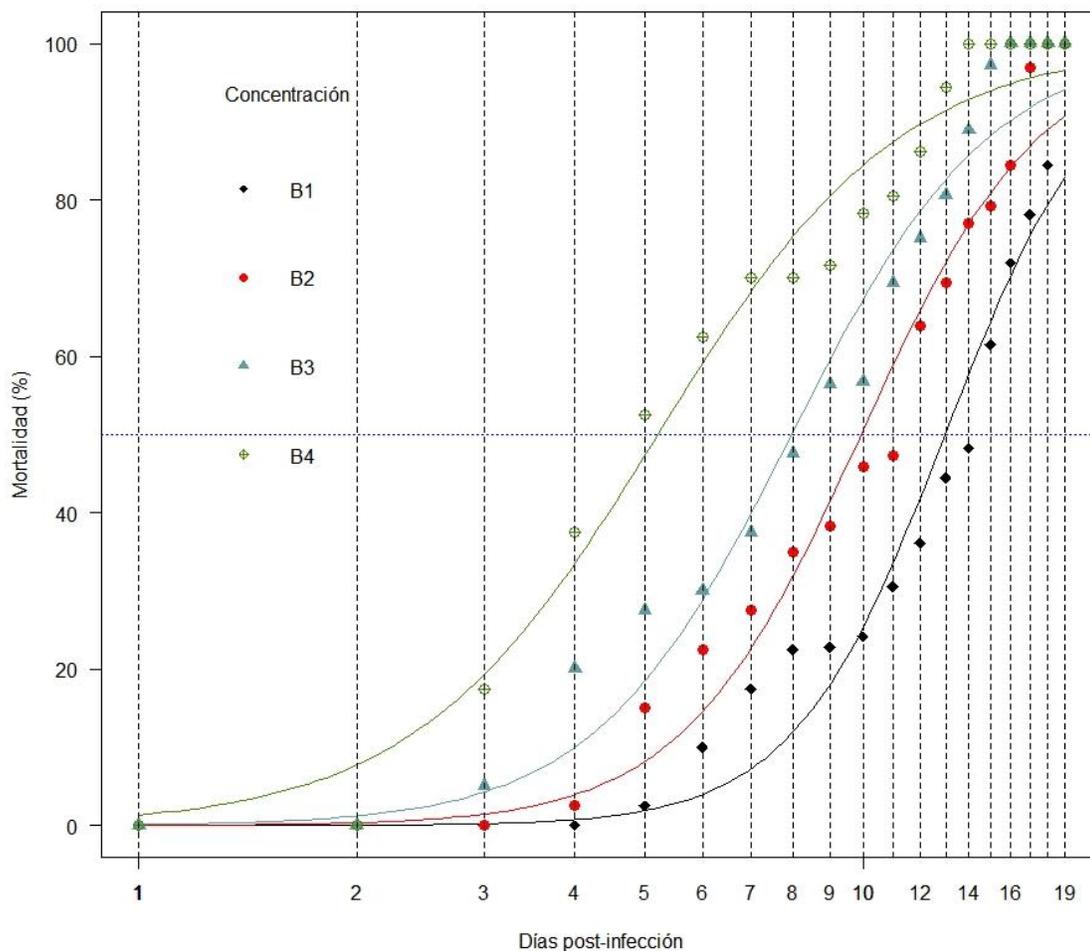
Tiempo letal medio para diferentes concentraciones de *B. bassiana*



Nota: Concentraciones de *B. bassiana* alcanzan el valor de TL50 en diferentes momentos del ensayo. B1 ($1,003 \times 10^5$) = 13,05976 días; B2 ($1,003 \times 10^6$) = 10,09281 días; B3 ($1,003 \times 10^7$) = 8,11669; B4 ($1,003 \times 10^8$) = 5,38099.

Figura 20

Tiempo letal medio para diferentes concentraciones de *M. anisopliae*



Nota: Concentraciones de *M. anisopliae* alcanzan el valor de TL50 en diferentes momentos del ensayo. B1 ($1,003 \times 10^5$) = 13,05976 días; B2 ($1,003 \times 10^6$) = 10,09281 días; B3 ($1,003 \times 10^7$) = 8,11669; B4 ($1,003 \times 10^8$) = 5,38099.

El estudio de la relación entre la variable dependiente (% de germinación) y dos variables independientes (tipo de hongo entomopatógeno y concentración del hongo entomopatógeno) lo realizamos en RStudio V1.3 con 0,05 como nivel de significancia, empleando un ANOVA con dos factores (Anexo 11).

Los datos arrojados por este análisis, nos indica que existe influencia significativa de la concentración con respecto al tiempo letal medio, ya que el valor-p resulto (0,04), resultó ser menor a 0,05. En contraste con el tipo de hongo, el cuál no presenta una influencia significativa con respecto al TL50, su valor-p fue de 0,934. La influencia de la combinación entre el tipo de hongo y su concentración no fue significativa, con un valor-p de 0,991, tal y como se observa en las Figuras 18 y 19 donde el crecimiento en ambos gráficos presenta una tendencia similar. Concluimos que el valor de TL50 fue alcanzado en menor tiempo con forme incremento la concentración del hongo y este crecimiento fue similar para *M. anisopliae*, y *B. bassiana*.

Capítulo 4: Discusión

Identificación morfológica de la especie de garrapata en el lugar de muestreo

El 100% de las garrapatas analizadas en el presente estudio se identificaron como *Rhipicephalus microplus*. La recolección de las mismas se realizó en una zona predominantemente tropical con condiciones ambientales propicias para el desarrollo de las garrapatas, su temperatura media anual es de 22.6°C, su humedad > 90% y presenta una altitud de 777 m.s.n.m. (Weather Atlas, 2020). En el Ecuador hay registro de los géneros *Boophilus*, *Amblyomma* e *Ixodes*, se muestran guías según pisos altitudinales, el género *Amblyomma* se encuentra en altitudes menores a 1000 m.s.n.m, mientras *Rhipicephalus* oscila entre los 600 a 2000 m.s.n.m. e *Ixodes* se encuentra comúnmente en alturas superiores a 1000 m.s.n.m. (Guillen & Muñoz, 2013).

A su vez varios autores, mencionan los siguientes factores climáticos como variables que inciden en la predominancia de *R. microplus* en Ecuador: temperatura superior a 16°C y humedad superior al 70%. (R. Rodríguez & Bustillos, 2014). Corroborando estos datos, Bolaños (2016) y Guillen & Muñoz(2013) en sus estudios taxonómicos de garrapatas, concluyen que a nivel general *R. microplus* es la especie que prevalece sobre las demás en el país. La ubicación espacial de las especies de garrapatas es importante en las estrategias de control de las garrapatas, ya que dependiendo de la especie y su ciclo de vida el manejo será diferente, en el caso de *R. microplus*, el cual pasa su vida en un solo hospedero el tratamiento y la frecuencia de aplicación de los acaricidas será diferente a *A. cajennense* la cual presenta un ciclo de vida de tres hospederos (Maya-Delgado et al., 2020).

Rhipicephalus microplus es considerada la garrapata tropical que causa mayores pérdidas al ganado vacuno debido a los parásitos que transmite como *Babesia bigemina* y *B. bovis* causando babesiosis, ó *Anaplasma marginale* causando anaplasmosis (Fernández Tondelli, 2006).

Las pérdidas económicas ocasionadas por esta garrapata se relacionan con las enfermedades transmitidas por los ectoparásitos así como por los daños directos generados en el ganado, y los gastos de control ese valor se estima en 7,3 USD/animal/ año (FAO, 2005). La resistencia a acaricidas ha generado también importantes pérdidas económicas, en Uruguay se estimó un costo de 20,3 USD por bovino para poder erradicar *R. microplus* del animal (Cuore et al., 2012).

En países donde *R. microplus* es un problema de sanidad, la resistencia a acaricidas se ha generalizado, la aparición de poblaciones resistentes surge por el uso constante de acaricidas, mediante exposiciones sucesivas a un mismo producto sobre las garrapatas y sus huevos (Klafke, de Albuquerque, Miller, & Schumaker, 2010).

La resistencia a acaricidas químicos aumenta directamente proporcional a la presión de selección, al eliminar las garrapatas que aún son susceptibles a los acaricidas, la progenie será más resistente, de esta forma si en un inicio existe una composición en la población de garrapatas susceptibles y resistentes, al final de la selección genética tendremos un cambio poblaciones heterogéneas, resistentes al producto químico (Davey, Miller, & George, 2008).

En el Ecuador Maya-Delgado et al. (2020) mostró que *R. microplus* se encuentra ampliamente distribuidos en Santo Domingo de los Tsáchilas, en 52 de las 84 fincas ganaderas estudiadas se encontró el alelo de resistencia a amitraz por parte de *R. microplus*, a su vez mencionan que aunque se encontraron genotipos homocigotos y heterocigotos, si el mal uso de los acaricidas químicos continua en un futuro se podría encontrar poblaciones completamente

resistentes a amitraz lo que generaría un problema mayor a nivel de sanidad animal y económico.

Identificación de conidias puras de *B. bassiana* y *M. anisopliae*

Los aislamientos observados en la figura 11, se muestran como colonias de color blanquecino, de aspecto algodonoso y con una superficie ligeramente elevada. En la figura 13 se muestran las imágenes microscópicas de los aislamientos, donde se observan conidióforos agrupados irregularmente, un raquis en forma de zigzag, el cuál sostiene el conidio, características compatibles con las descritas para *Beauveria bassiana* por Bustillo (2001) & D. S. Rodríguez & Del Pozo (2003). Los conidios lisos con una forma globosa, y formación de racimos son características de esta especie y se mencionan en investigaciones realizadas por (Humber, 2005) (Torres et al., n.d.).

Los aislados del hongo entomopatógeno presente en la figura 12 se caracterizó por presentar inicialmente colonias blancas algodonosas y al madurar tomaron una tonalidad verde olivo, al reverso presentaron un color amarillo intenso, estas características fueron mencionadas por Bischoff, Rehner, & Humber (2009); Driver, Milner, & Trueman (2000) quienes las identificaron como cepas de *M. anisopliae*. En cuanto a las características microscópicas, se observaron conidios alargados, cilíndricos los cuales se dispusieron en forma de cadenas paralelas, el conidióforo con crecimiento irregular, hifas son lisas y septadas y fialides delgadas en el ápice, características que coinciden con lo descrito por (Cárdenas et al., 2016; Machado Alvarez, 2013).

Influencia de la concentración de esporas por mililitro en el porcentaje de mortalidad

La presencia de micosis observada en las garrapatas sometidas a diferentes diluciones de hongos entomopatógenos, y no en el tratamiento control a base de agua destilada estéril,

indica que el empleo de *B. bassiana* y *M. anisopliae* fue la causa de la muerte de las garrapatas adultas *R. microplus*, conclusiones similares obtuvieron Frazzon, Vaz Junior, Masuda, Schrank, & Vainstein (2000), y Gindin, Samish, Zangi, Mishoutchenko, & Glazer (2002), ya que al evaluar la mortalidad en teleóginas, indicaron que sus porcentajes de mortalidad fueron elevados al emplear hongos en su tratamiento en comparación con el tratamiento testigo.

En el presente estudio la concentración $1,003 \times 10^8$ esporas/ml obtuvo mayor efectividad en comparación con los demás tratamientos, alcanzando una mayor mortalidad en menor tiempo, característica que se mantuvo consistente en el desarrollo del ensayo. Resultados similares fueron señalados por varios autores, Ming et al. (2011) concluye que su concentración de 1×10^8 esporas/ml de *B. bassiana* y *M. anisopliae* fueron altamente eficientes en el control de hembras ingurgitadas, presentando el 100% de mortalidad en el día 10 después de la inoculación. Empleando la misma concentración Broglio et al. (2012) presentó una tasa de mortalidad de teleoginas entre 92 a 100% empleando el hongo *M. anisopliae* a los 14 días.

Los dos tratamientos que presentaron las concentraciones $1,6 \times 10^5$ y $1,01 \times 10^6$ esporas/ml presentaron resultados menos eficaces en la muerte de ejemplares adultos de *R. microplus*, sin embargo, se ratificó que *B. bassiana* y *M. anisopliae* ejercen control biológico sobre esta especie de garrapata.

La formación de micelio sobre la superficie de las garrapatas fue observada en los dos hongos, con mayor rapidez en los tratamientos tratados con *Metarhizium anisopliae*. Estos resultados concuerdan con otros autores, debido a que la mayoría de éstos han reportado una mayor mortalidad de garrapatas empleando este hongo, como el estudio de Valbuena & Alzate (2007) sus tratamientos con la cepa de *M. anisopliae*, en comparación con los tratamientos de la cepa formulada de *B. bassiana*, demostraron mayor colonización en la cutícula del hospedero, mencionan que esto pudo deberse a que *M. anisopliae*, se adapta de mejor manera a diversas

condiciones de temperatura y humedad y además es capaz de formar una estructura adhesiva, de la cual origina una hifa afilada que rompe la barrera externa de las garrapatas ingresando a sus células epidérmicas, permitiendo la penetración del micelio, característica que *B. bassiana* no presenta, pues su hifa infectiva es más sensible, ocasionando un menor desarrollo del hongo sobre el hospedero.

Análisis del CL50 (Concentración letal media) para *B. bassiana* y *M. anisopliae*

M. anisopliae presentó una CL50 correspondiente a $7,06945858 \times 10^4$ esporas/ml, mientras que a *B. bassiana* le corresponde un valor de $6,7670 \times 10^4$ esporas/ml. Oporta (2017) nos indica que el valor obtenido es considerado bajo, lo cual nos indica un alto grado de patogenicidad. Valbuena & Alzate (2007) compararon las mismas cepas de hongos frente a larvas de *R. microplus* encontrando una CL50 de $8,16 \times 10^4$ esporas/ml para el hongo *M. anisopliae* y $8,36 \times 10^3$ esporas/ml para *B. bassiana*, obteniendo una buena eficacia a nivel *in vitro* con una concentración mínima similar a la presentada en este estudio.

La tendencia de la mortalidad de *Rhipicephalus microplus* a través del tiempo frente a ambos hongos siguió un mismo patrón, en el cual, una mayor concentración generó una mayor mortalidad de las garrapatas en estado adulto. En la investigación realizada por Oporta (2017) se enfocaron en estudiar la patogenicidad de *M. anisopliae* en teleoginas (garrapatas adultas ingurgitadas) de *R. microplus*, encontrando una alta susceptibilidad en todas sus concentraciones evaluadas, su CL50 fue $1,2 \times 10^4$ conidios/ml. M. Fernández, Zhioua, & García (2005) por su parte reportaron una concentración letal media de 1×10^2 conidios/ml para una cepa de *R. microplus* resistente a los organosfosforados y 1×10^3 conidios/ml para cepas susceptibles, convirtiendo a sus cepas estudiadas en microorganismos con alto potencial de parasitismo y mortalidad.

Análisis del TL50 (Tiempo letal media) para *B. bassiana* y *M. anisopliae*

A mayor concentración, el tiempo para eliminar al 50% de la población de las garrapatas disminuyó, para la concentración $1,003 \times 10^8$ esporas/ml el TL50 de *M. anisopliae* fue de 5,20688 días y 5,38099 días para *B. bassiana*. Valbuena & Alzate (2007) evaluaron concentraciones iguales y superiores analizadas en este estudio, su concentración de 1×10^8 esporas/ml de *M. anisopliae* arrojó un TL50 de 5 días, coincidiendo con nuestro resultados, pero presentando una diferencia significativa con la concentración de 1×10^9 esporas/ml ya que su TL50 fue de tres días, por lo que sería adecuado elevar la concentración del producto empleado en este estudio para obtener una actividad virulenta en menor tiempo.

Beltrán, Gutiérrez, & Saldarriaga (2008) en su estudio sobre el hongo *Lecanicillium lecanii* sobre *R. microplus*, reportaron que a una concentración de $1,25 \times 10^8$ esporas/ml su TL50 fue de 10 días, mientras que Galindo, Pulido, & García (2018) emplearon *B. bassiana* a esta misma concentración y obtuvieron un tiempo letal medio de 12,5 días, Raymond et al. (2004) determinaron que aminoácidos hidrofóbicos encontrados en la cutícula, influyen la germinación de las conidias de los hongos y consecuentemente la penetración de la hifa, pudiendo explicar la variación de este valor reportada por diversos autores. Los resultados de este estudio indican que ambos hongos generaron presencia de micosis en las garrapatas tratadas, comprobando que esta fue la causa de su muerte. Sin embargo Motta & Murcia (2011), afirmaron que aún presentando una germinación por debajo del 50% la eliminación de las garrapatas puede ser ocasionada por una alta producción de toxinas sobre las mismas, antes de la muerte de los conidios.

Capítulo 5: Conclusiones

En el presente estudio se identificó únicamente la especie *R. microplus* en el ganado bovino, de la finca "La Maminita" ubicada en San Miguel de los Bancos, provincia de Pichincha.

M. anisopliae logro alcanzar la mortalidad del 100% de las garrapatas a los 13,5 días empleando la concentración $1,003 \times 10^8$ esporas/ml, mientras que para *B. bassiana* empleando la misma concentración, el 100% de los ectoparásitos se eliminaron a los 14,5 días. Indicando que no hubo una diferencia significativa de los hongos analizados con respecto al efecto acaricida ejercido sobre la garrapata *R. microplus* en su estado adulto a nivel de laboratorio.

La concentración de conidios que determina la CL50 de *M. anisopliae* es de $7,06945858 \times 10^4$ esporas/ml mientras que para *B. bassiana* es de $6,7670 \times 10^4$ esporas/ml sobre *R. microplus* en estado adulto. Indicando una mayor mortalidad a mayor concentración.

La concentración de esporas que determina el TL50 es $1,003 \times 10^8$ esporas/ml, a los 5,2 días para *M. anisopliae* y 5,4 para *B. bassiana*. Indicando que al emplear una mayor concentración, se requiere un menor tiempo para lograr la mortalidad en los ectoparásitos.

Capítulo 6: Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios de cepas nativas en diferentes regiones geográficas del Ecuador, y generar programas de control de esta plaga, ya que la variabilidad genética de los hongos entomopatógenos, permite un mayor o menor alcance de hospederos y un mayor porcentaje de virulencia.

Se recomienda realizar investigaciones en todos los estadios de la garrapata *R. microplus*, con diferentes formulaciones que puedan ser empleadas en condiciones de campo.

Se observó que los efectos patogénicos tienden a incrementar a medida que aumenta la concentración del hongo, por lo que se sugiere según este estudio emplear la concentración $1,003 \times 10^8$ esporas/ml o superiores de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Se recomienda la utilización de *B. bassiana* y *M. anisopliae* como una alternativa para el control de la plaga *R. microplus*, ya que podría reducir la aplicación de químicos acaricidas, reduciendo consecuentemente el impacto ambiental generado por estas sustancias, así como el riesgo de adquirir resistencia a los químicos por parte de los ectoparásitos .

Bibliografía

- Abbas, R. Z., Zaman, M. A., Colwell, D. D., Gilleard, J., & Iqbal, Z. (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary Parasitology*, Vol. 203, pp. 6–20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006>
- Alvarado, R., & Dixon, J. (2010). *Identificación de las principales especies de garrapatas que afectan al ganado bovino en el municipio de Mulukuku, RAAN.*
- Alvarez, Bonilla, & Chacón. (2003). Frecuencia relativa de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) en bovinos (*Bos taurus* y *B. indicus*) en ocho zonas ecológicas de Costa Rica. Retrieved December 17, 2019, from https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442003000200015
- Bahiense, T. C., Fernandes, E. K. K., Angelo, I. da C., Perinotto, W. M. d. S., & Bittencourt, V. R. E. P. (2007). Evaluation of the biological control potential of *Metarhizium anisopliae* toward *Boophilus microplus* in pen trials. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology : Órgão Oficial Do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 16(4), 243–245. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612007000400012>
- Barandika, J. F. (2010). Las garrapatas exófilas como vectores de agentes zoonóticos: estudio sobre la abundancia y actividad de las garrapatas en la vegetación, e investigación de la presencia de agentes patógenos en garrapatas y micromamíferos. Retrieved January 13, 2020, from <https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/922/2009ON-BARANDIKA IZA, JESÚS FÉLIX.pdf?sequence=1>
- Bazán, M. (2002). Efecto de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en el control biológico de *Boophilus microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae) en ganado bovino estabulado. Retrieved January 16, 2020, from

<http://bvirtual.ucol.mx/consultaxcategoria.php?categoria=3&id=5797>

- Beltrán, C., Gutiérrez, A., & Saldarriaga, Y. (2008). Pathogenicity of *Lecanicillium lecanii* (Fungi) on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in the laboratory conditions. Retrieved September 20, 2020, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882008000100012#\(fig2\)](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882008000100012#(fig2))
- Betancur, O. J., & Ríos, C. G. (2018). Economic and Health Impact of the Ticks in Production Animals. In *Ticks and Tick-Borne Pathogens*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81167>
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anispliae* lineage. *Mycologia*, *101*(4), 512–530. <https://doi.org/10.3852/07-202>
- Bolaños, D. F. (2016). *Distribución geográfica y caracterización taxonómica de las especies de garrapatas que afectan al ganado bovino en la provincia de Los Ríos*.
- Broglio, S., Leilianne, S., Ellen, V., Araújo, M., Dias, N., & Gómez, M. (2012). Evaluation of entomopathogenic fungi as biological control agents (Acari : Ixodidae). *Idesia*, *30*(1), 93–99. Retrieved from <http://www.scielo.cl/pdf/idesia/v30n1/art11.pdf>
- Burger, T. D., Shao, R., & Barker, S. C. (2014). Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, contains a cryptic species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *76*(1), 241–253. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.03.017>
- Bustillo, A. (2001). Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia . In Comité Regional de Cundinamarca Socolen (Ed.), *Uso de entomopatógenos en Colombia* (1st ed., pp. 30–54). Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/275462138_HONGOS_EN_INSECTOSy_POSIBILIDADES_DE_USO_EN_EL_CONTROL_BIOLOGICO_DE_PLAGAS_EN_COLOMBIA

- Calox. (2012). Ciclo de vida de la garrapata - Calox Veterinaria Centroamérica - Productos veterinarios para ganadería, mascotas, aves y cerdos. Retrieved January 13, 2020, from <https://www.caloxvetcentroamerica.com/ciclo-de-vida-de-la-garrapata/>
- Cárdenas, Y., Márquez, M., Baró, Y., Porras, Á., Ulloa, Y., & Quesada, Y. (2016). Caracterización de aislados cubanos del complejo de especies *Metarhizium anisopliae* con actividad patogénica frente a *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae). Retrieved September 14, 2020, from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522016000100007
- Castillo Vélez, M. J. (2015). *Análisis de la Productividad y Competitividad de la Ganadería de Carne en el Litoral Ecuatoriano*. Retrieved from www.rimisp.org
- Cortés Jesús Alfredo. (2018). Integrated control of ticks and its importance for public health. Retrieved December 15, 2019, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572018000400452
- Cuore, U., Altuna, M., Cicero, L., Fernández, F., Luengo, L., Mendoza, R., ... Trelles, A. (2012). Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población multirresistente de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay | Veterinaria (Montevideo). Retrieved October 8, 2020, from <http://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/204>
- Davey, R., Miller, R., & George, J. (2008). *Efficacy of amitraz applied as a dip against an amitraz-resistant strain of Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) infested on cattle*. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.012>
- Díaz, A., Rodríguez, Fragoso, & Cruz, R. (2006). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(2), 105–113. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2006000200003>

- Driver, F., Milner, R., & Trueman, J. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Retrieved September 14, 2020, from http://cordyceps.us/files/Driver_etal_2000.pdf
- Estrada, A. (2015). CLASE ARACHNIDA Orden Ixodida: Las garrapatas. *Revista IDE@-SEA, N° 13*, 1–15. Retrieved from www.sea-entomologia.org/IDE@
- Estrada, M. G. (2018). *Determinación de la prevalencia y clasificación morfológica de garrapatas, mediante observación directa y examen clínico en caninos de la parroquia de Guayllabamba, Pichincha.*
- Fan, Y., Fang, W., Guo, S., Pei, X., Zhang, Y., Xiao, Y., ... Pei, Y. (2007). Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology, 73*(1), 295–302. <https://doi.org/10.1128/AEM.01974-06>
- FAO. (2005). *Ticks: Acaricide resistance: diagnosis, management, and prevention.*
- FAO. (2008). Perfil de proyecto. Retrieved April 17, 2018, from <http://www.fao.org/docrep/008/a0322s/a0322s03.htm>
- Fernandes, É. K. K., Bittencourt, V. R. E. P., & Roberts, D. W. (2012). Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Experimental Parasitology, 130*(3), 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.11.004>
- Fernández, J. A. (2006). *EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL CONTROL DE GARRAPATAS (Boophilus microplus) CON TRES FRECUENCIAS DE APLICACIÓN DE BAZAM® (Beauveria bassiana).*
- Fernández, M., Zhioua, E., & García, Z. (2005). *Infectividad de Metarhizium anisopliae en contra de cepas de garrapata Boophilus microplus sensible y resistente a los organofosforados.* Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61343313>
- Fernández Tondelli, J. A. (2006). *Evaluación de la eficiencia del control de garrapatas (Boophilus*

microplus) con tres frecuencias de aplicación de BAZAM[®] (*Beauveria bassiana*) [Tesis para Título].

- Frazzon, A. P., Vaz Junior, I. D. S., Masuda, A., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2000). In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 94(1–2), 117–125. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00368-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00368-X)
- Galindo, A., Pulido, M., & García, D. (2018). Efecto de *Beauveria bassiana* (ascomycota) en el control de *Rhipicephalus microplus* (Arachnida: Ixodida, Ixodidae) resistentes a ixodicidas. In *Revista Científica*. Retrieved from <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/29760>
- Gindin, G., Samish, M., Zangi, G., Mishoutchenko, A., & Glazer, I. (2002). The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. *Experimental and Applied Acarology*, 28(1–4), 283–288. <https://doi.org/10.1023/A:1025379307255>
- Gragera, Roncero, Montes, & Habela, M. (2005). (PDF) Enfermedades por garrapatas en bovino: situación epidemiológica en España y recomendaciones para el control. Retrieved January 13, 2020, from https://www.researchgate.net/publication/28280897_Enfermedades_por_garrapatas_en_bovino_situacion_epidemiologica_en_Espana_y_recomendaciones_para_el_control
- Guajardo. (2015). Control biológico e integrado de la garrapata “*Hyalomma lusitanicum*” en explotaciones silvo-agro-cinegéticas de ecosistema mesomediterráneo - Dialnet. Retrieved January 13, 2020, from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=99095>
- Guglielmono, A. A., Robbins, R. G., Apanaskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Peña, A., Horak, I. G., ... Barker, S. C. (2010). Article The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, 0000. Retrieved from

www.mapress.com/zootaxa/

- Guillen, N., & Muñoz, L. (2013). Estudio taxonómico a nivel de género de garrapatas en ganado bovino de la Parroquia Alluriquín - Santo Domingo de los Tsáchilas. Retrieved September 10, 2020, from <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/7264?locale-attribute=de>
- Hesketh, H., Roy, H. E., Eilenberg, J., Pell, J. K., & Hails, R. S. (2010). Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of Insects. In *The Ecology of Fungal Entomopathogens* (pp. 55–73). https://doi.org/10.1007/978-90-481-3966-8_5
- Humber, R. (2005). *Entomopathogenic Fungal Identification updated November 2005*. Retrieved from <http://arsef>.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., & Strasser, H. (2001). *Use of Hyphomycetous Fungi for Managing Insect Pests*. Retrieved from <https://www.cabi.org/isc/fulltextpdf/2001/20013125209.pdf>
- Jongejan, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, Vol. 129. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>
- Jonsson, N. (2006, April 15). The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*, Vol. 137, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.010>
- Kabaluk, T., & Gazdik, K. (2005). Directory of Microbial Pesticides for Agricultural Crops in OECD Countries . Retrieved October 8, 2020, from https://books.google.com.ec/books/about/Directory_of_Microbial_Pesticides_for_Ag.html?id=Wow4ngAACAj&redir_esc=y
- Klafke, G. M., de Albuquerque, T. A., Miller, R. J., & Schumaker, T. T. S. (2010). Selection of an

- ivermectin-resistant strain of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 168(1–2), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.10.003>
- Labruna, M. (n.d.). *Anatomía Externa de las Garrapatas, con Énfasis en la Familia Ixodidae*. (p. 14). p. 14. Sao Paulo.
- Leemon, D. M., Turner, L. B., & Jonsson, N. N. (2008). Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Veterinary Parasitology*, 156(3–4), 248–260. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.06.007>
- Lopez, B. (2016). Análisis de la interacción de acaricidas de nueva generación con los agentes de control biológico *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae) y *Beauveria Bastiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) para su correcta incorporación al Manejo Integrado de *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) . Retrieved October 8, 2020, from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=48486>
- Machado Alvarez, A. S. (2013). *Caracterización morfológica, biológica y molecular de 20 cepas de metarhizium anisopliae*. Retrieved from <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/25159>
- Maya-Delgado, A., Madder, M., Benítez-Ortíz, W., Saegerman, C., Berkvens, D., & Ron-Garrido, L. (2020). Molecular screening of cattle ticks, tick-borne pathogens and amitraz resistance in ticks of Santo Domingo de los Tsáchilas province in Ecuador. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(5), 101492. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101492>
- Ming, S., Qiaoyun, R., Guiquan, G., Zhijie, L., Miling, M., Huitian, G., ... Jianxun, L. (2011). Virulence of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* to the engorged female *Hyalomma anatolicum anatolicum* tick (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 180(3–4), 389–393. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.027>
- Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en

- Nicaragua. Retrieved January 15, 2020, from <http://www.bionica.info/Biblioteca/Monzon2001HongoEntomopatogenos.pdf>
- Mora, M., Castilho, A., & Fraga, M. (2018). Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 84(0).
<https://doi.org/10.1590/1808-1657000552015>
- Morocho, D. (2019). *Evaluación in vivo de Metarhizium anisopliae y Beauveria bassiana sobre garrapatas que parasitan el ganado vacuno en el chaco, Ecuador.*
- Motta, A., & Murcia, B. (2011). *Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas.* <https://doi.org/10.4136/1980-993X>
- Muñoz, L. E. (2013). *Estudio taxonómico a nivel de género de garrapatas en ganado bovino de la parroquia Alluriquín-Santo Domingo de los Tsáchilas.*
- Nakano, Silveira, N., & Zucchi. (1981). *Entomologia Econômica.* Retrieved January 14, 2020, from [https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&biblioteca=vazio&busca=autor:%22NAKANO, O. SILVEIRA NETO, S.%22](https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&biblioteca=vazio&busca=autor:%22NAKANO,%20O.%20SILVEIRA%20NETO,%20S.%22)
- Nava, S., Beati, L., Labruna, M. B., Cáceres, A. G., Mangold, A. J., & Guglielmone, A. A. (2014). Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(3), 252–276. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.004>
- Navarrete, L., Rodríguez, E. A., Valle, C., Vargas, M., & Romero, P. (2014). *Principales especies de garrapatas (Ixodidae) en el Salvador.*
- Onofrio, V. C., Barros, D. M., Labruna, M. B., & Faccini, J. L. H. (2009). Diagnoses of and illustrated key to the species of *Ixodes* Latreille, 1795 (Acari: Ixodidae) from Brazil.

- Systematic Parasitology*, 72(2), 143–157. <https://doi.org/10.1007/s11230-008-9169-z>
- Oporta, J. (2017). *Control microbiano de la garrapata Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) del ganado bovino, con hongos entomopatógenos en condiciones de laboratorio*. Juigalpa.
- Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. O. (2013, September). Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*, Vol. 4, pp. 357–374.
<https://doi.org/10.3390/insects4030357>
- Ostfeld, R. S., Price, A., Hornbostel, V. L., Benjamin, M. A., & Keesing, F. (2006). Controlling Ticks and Tick-borne Zoonoses with Biological and Chemical Agents. *BioScience*, 56(5), 383–394.
[https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2006\)056\[0383:ctatzw\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2006)056[0383:ctatzw]2.0.co;2)
- Pascual, A. (2014). *Formulacion con hongos entomopatogenos para el control de plagas*. Retrieved from <https://patents.google.com/patent/WO2015080545A1/es>
- Pérez, X. F. (2016). RESISTENCIA A ALFA-CIPERMETRINA, IVERMECTINA Y AMITRAZ EN GARRAPATAS *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) COLECTADAS EN CUATRO LOCALIDADES. Retrieved December 20, 2019, from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/10254/1/T-UCE-0014-011-2016.pdf>
- Pesquera, C., Portillo, A., Palomar, A. M., & Oteo, J. A. (2015). *Investigation of tick-borne bacteria (Rickettsia spp., Anaplasma spp., Ehrlichia spp. and Borrelia spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador*.
<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0662-3>
- Piguave, R. (2016). *Evaluación del efecto acaricida del hongo entomopatógeno (Lecanicillium lecanii) en el control de las garrapatas en el ganado vacuno* (p. 56). p. 56. Retrieved from <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/20789>
- Polanco, D., & Alberto, L. (2016). *Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras*.

- Raymond, K., Rojas, F., Benavides, E., Cotes, A., Villamizar, L., Ronderos, V., & García, P. (2004). Effect of entomopathogenic fungi on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodida): use of pathogenicity activators. Retrieved September 20, 2020, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882004000100001
- Rodriguez-Vivas, R., Jonsson, N., & Bhushan, C. (2018, January 1). Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology Research*, Vol. 117, pp. 3–29. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6>
- Rodríguez, D. S., & Del Pozo. (2003). *Aislamiento de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* West.*
- Rodríguez, R., & Bustillos, R. (2014). *Ecología parasitaria de la garrapata (acari: ixodidae) en bovinos en dos áreas geográficas del Ecuador.* Quito: UCE.
- Rodríguez, R. I., Rosado, J. A., Ojeda, M. M., Pérez, L. C., Martínez, I. T., & Bolio, M. E. (2014). Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. Retrieved January 10, 2020, from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282014000300009
- Rodríguez, R., Pérez, X., Garcés, S., Vanwambeke, S. O., Madder, M., & Benítez, W. (2017). The current status of resistance to alpha-cypermethrin, ivermectin, and amitraz of the cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) in Ecuador. *PLoS ONE*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174652>
- Rosario-Cruz, R., Almazan, C., Miller, R. J., Dominguez-Garcia, D. I., Hernandez-Ortiz, R., & De La Fuente, J. (2009). Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Frontiers in Bioscience*, 14(7), 2657–2665. <https://doi.org/10.2741/3403>
- Rosario, R. (2010). Estrategias para el control de la garrapata *Boophilus microplus* y la mitigación de la resistencia a los pesticidas. Retrieved January 16, 2020, from

https://www.researchgate.net/publication/304102212_ESTRATEGIAS_PARA_EL_CONTROL_DE_LA_GARRAPATA_Boophilus_microplus_Y_LA_MITIGACION_DE_LA_RESISTENCIA_A_LOS_PESTICIDAS

Sahagún, Á., Gutiérrez, R., Molina, J., Rubio, A., Skoda, S. R., Cruz-Vázquez, C., ... Foster, J. E.

(2010). Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus=Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions.

Veterinary Parasitology, 170(3–4), 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.037>

Samish, M., Ginsberg, H., & Glazer, I. (2004). Biological control of ticks. *Parasitology*, Vol. 129.

<https://doi.org/10.1017/S0031182004005219>

Suquilanda, M. (2017). Manejo agroecológico de plagas MSV | Pesticida | Plaga (organismo).

Retrieved January 16, 2020, from <https://es.scribd.com/document/373744779/Manejo-agroecologico-de-plagas-MSV>

Téllez, A., Cruz, M., Mercado, Y., Torres, A., & Cuenca, A. (2009). Mecanismos de acción y

respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. Retrieved August 23, 2020, from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802009000200007

Torres, J., De la Cruz, M., Pérez, M., Cruz, A., Ortiz, C., & Capello, S. (n.d.). Caracterización de

aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y su patogenicidad hacia *Hypothenemus hampei*, en Tabasco, México. Retrieved September 12, 2020, from <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v42n1/v42n1a06.pdf>

Valbuena, 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) en su fase parasítica en los estados larval y ninfal. Retrieved September 15, 2020, from <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8952/Trabajo de grado.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Vinueza, R. (2015). *Caracterización e identificación de garrapatas en bovinos de 3 islas en la provincia de Galápagos*.

Weather Atlas. (2020). Santo Domingo de los Colorados, Ecuador - Información detallada del clima y previsión meteorológica mensual | Weather Atlas. Retrieved September 10, 2020, from <https://www.weather-atlas.com/es/ecuador/santo-domingo-de-los-colorados-clima>

Anexos