



**UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABÍ**  
**EXTENSIÓN EL CARMEN**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

Creada Ley No 10 – Registro Oficial 313 de Noviembre 13 de 1985

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

TRABAJO EXPERIMENTAL PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO  
AGROPECUARIA

**“*Beauveria bassiana* para control biológico de (*Rhipicephalus microplus*) en  
ganado bovino”**

**AUTOR:** García Carrasco José Andrés

**TUTOR:** Mvz. Kleber Fernando Mejía Chanaluisa, Mg. Sc.

El Carmen, abril del 2023

	NOMBRE DEL DOCUMENTO: CERTIFICADO DE TUTOR(A)	CÓDIGO: PAT-01-F-010
	PROCEDIMIENTO: TITULACIÓN DE ESTUDIANTES DE GRADO	REVISIÓN: 2
		Página 1 de 69

## CERTIFICACIÓN

En calidad de docente tutor(a) de la carrera de Ingeniería Agropecuaria de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, CERTIFICO:

Haber dirigido y revisado el trabajo de investigación, bajo la autoría del estudiante **García Carrazco José Andrés**, legalmente matriculado en la carrera de Ingeniería Agropecuaria, período académico 2023-1, cumpliendo el total de 400 horas, bajo la opción de titulación de proyecto de investigación, cuyo tema del proyecto es **“*Beauveria bassiana* para control biológico de *Rhipicephalus microplus* en ganado bovino”**.

La presente investigación ha sido desarrollada en apego al cumplimiento de los requisitos académicos exigidos por el Reglamento de Régimen Académico y en concordancia con los lineamientos internos de la opción de titulación en mención, reuniendo y cumpliendo con los méritos académicos, científicos y formales, suficientes para ser sometida a la evaluación del tribunal de titulación que designe la autoridad competente.

Particular que certifico para los fines consiguientes, salvo disposición de Ley en contrario.

El Carmen, 17 de abril de 2023.

Lo certifico,

Mvz. Mejía Chanaluisa Kleber Fernando, Mg. Sc.  
**Docente Tutor**  
**Área:** Agricultura, Silvicultura, Pesca y Veterinaria

**UNIVERSIDAD LAICA "ELOY ALFARO" DE MANABÍ  
EXTENSIÓN EL CARMEN**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**TÍTULO:**

*Beauveria bassiana* para control biológico de (*Rhipicephalus microplus*) en ganado bovino

**AUTOR:** García Carrazco José Andrés

**TUTOR:** Mejía Chanaluisa Kleber Fernando

**TRABAJO EXPERIMENTAL PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERO AGROPECUARIA**

**TRIBUNAL DE TITULACIÓN**

**MIEMBRO:** Dr. Marco Vinicio Acosta Jácome, Mg

**MIEMBRO:** Ing. Myriam Elizabeth Zambrano Mendoza, Mg

**MIEMBRO:** Ing. Janeth Rocío Jácome Gómez, Mg

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de investigación a toda mi familia en especial a mi Papá que es el motor fundamental de este logro a Mamá y Hermanos que son la fuerza dentro de mi formación como profesional, a mis tíos a cada uno de ellos que siempre estuvieron pendiente de cada paso que doy a mis amigos que dentro de todo este tiempo de la carrera pasaron ser parte de mi familia nos dimos el apoyo necesario, como familia agropecuaria que somos, siempre estuvieron en los peores y buenos momentos, a los Docentes brindando esa compañía necesaria y enseñanzas para estar de acuerdo en las decisiones tomadas, a mi tutor el Dr. Kleber Mejía y a docente que más que docente es un excelente amigo Dr. David Napoleón que son parte de este proceso con su apoyo, también fue algo complicado pero que de apoco se dio, con los ánimos de mis seres queridos, en los momentos en que más necesitaba, que podía renunciar pero que con el apoyo de cada uno salí adelante, agradecer el cariño de mi madre Jaqueline que estuvo ahí a mis tres hermanos Willy, Ivanna, Pablo, primos y también en especial a mi Padre Jose García que gracias ah el soy lo que soy, con sus enseñanzas de ser un hombre de bien, también a mi tíos y prima del exterior que aunque no estaba cerca de ellos y solo podía verlos por medio de un teléfono, siempre estuvieron presentes,

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecido con todas las personas que estuvieron presente en mi formación como profesional a mi familia, amigos y los docentes que brindaron todos sus conocimientos durante estos 5 años, fue algo complicado el proceso, pero se logró el objetivo al final, Así adquirir muchos conocimientos que son la pauta, para la vida laboral que me espera como profesional, y muy grato saber que uno ya no sale como estudiante, si no como un colega más, son muchas las horas que se pasaron dentro del aula así como en las practicas, pasando muchos momentos alegres y triste a la vez y saber que llega un momento donde todo esto llega a un final y pasas a otra etapa donde la vida te forja a ser más fuerte y responsable, donde todo lo transcurrido de tu carrera , han reforzado una gran amistad, y comprender el arduo trabajo que se realiza y así tener los conocimientos necesario para impartir fuera de nuestra alma mater.

Agradecer de forma más cordial y atenta al mi tutor Dr. Kleber Mejía también al Dr. David Napoleón, Lic. Javier Chumo a mi amigo el Ing. Jean Carlos Cedeño y a todos mis amigos que son un sinnúmero eternamente agradecido, mis amigos especiales Anderson, Milenita, Taty, Thomas ,Stalin, Nery, Fabián y mi compadre Carlos Bryan, a un amigo también muy especial al Ab. Santiago Rodríguez gracias a su apoyo como jefe más que jefe un gran amigo con sus concejos impartidos, a Jessica gracias por su apoyo incondicional eternamente agradecido con todos fueron la guía para poder dirigir con éxito mi investigación y que me dio el apoyo, junto con los recursos necesarios para que todo salga bien.

## ÍNDICE

CERTIFICACIÓN .....	I
DEDICATORIA .....	III
AGRADECIMIENTO .....	IV
ÍNDICE.....	V
ÍNDICE DE TABLAS .....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE ANEXO.....	XI
RESUMEN .....	XII
INTRODUCCIÓN .....	1
Problema científico .....	2
Objetivos .....	5
Objetivo general .....	5
Objetivos específicos.....	5
Hipótesis.....	5
Hipótesis alternativa .....	5
Hipótesis nula .....	5
CAPÍTULO I .....	6
1    MARCO TEÓRICO .....	6
1.1    Generalidades de las garrapatas .....	6
1.2    Biología de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	7
1.3    Características relevantes para la identificación de <i>Rhipicephalus (Boophilus)</i> <i>microplus</i> .....	8

1.4	Ciclo de vida .....	9
1.5	Ecología Parasitaria de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	10
1.6	Impacto económico del <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	11
1.7	Métodos de control de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	12
1.7.1	Control químico de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	12
1.7.2	Control biológico de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	13
1.7.3	Resistencia a Acaricidas del <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	14
1.8	Hongos entomopatógenos .....	15
1.9	Cordyceps ( <i>Beauveria</i> ) <i>bassiana</i> .....	16
1.9.1	Mecanismo de acción .....	16
1.9.2	Efecto Golpe .....	21
1.9.3	Bioensayos .....	22
CAPITULO II .....		24
2	INVESTIGACIONES EXPERIMENTALES AFINES AL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	24
CAPÍTULO III .....		28
3	MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
3.1	Localización de la unidad experimental .....	28
3.2	Caracterización agroecológica de la zona .....	28
3.3	Variables .....	29
3.4	Variables independientes .....	29
3.5	Variable dependiente .....	30
3.6	Población de <i>Rhipicephalus microplus</i> para tratamiento .....	30

3.7	Producción de conidias .....	30
3.8	Elaboración de medio líquido .....	30
3.9	Cultivo de la cepa de <i>Beauveria bassiana</i> .....	31
3.10	Elaboración de inoculación de las bolsas.....	31
3.11	Control de calidad de la producción .....	32
3.11.1	Conteo de Blastosporas.....	32
3.11.2	Medición de la concentración de la suspensión fungosa .....	33
3.11.3	Prueba de viabilidad.....	33
3.12	Montaje del Bioensayo en el laboratorio .....	33
3.12.1	Descripción de tratamientos in vitro .....	33
3.12.2	Análisis estadístico.....	34
3.12.3	Prueba de patogenicidad .....	34
3.12.4	Medición de la esporulación .....	34
3.12.5	Prueba de campo.....	35
CAPÍTULO IV.....		36
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
4.1	Efectividad antiparasitaria, mortalidad y tiempo de acción <i>in vitro</i> . .....	36
4.2	Determinación del grado de infestación de los animales.....	37
4.3	Efectividad antiparasitaria, mortalidad y tiempo de acción <i>in situ</i> . .....	38
CAPITULO V.....		43
5	CONCLUSIONES.....	43
CAPITULO VI.....		43
6	RECOMENDACIONES .....	43

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXOS .....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Garrapatas Reportadas en Ecuador .....	11
<b>Tabla 2</b> Principales metabolitos producidos por hongos entomopatógenos .....	19
<b>Tabla 3</b> Características agroecológicas de la localidad.....	29
<b>Tabla 4</b> Efectividad in vitro de diferentes concentraciones de <i>Beauveria bassiana</i> sobre garrapatas. ....	36
<b>Tabla 5</b> Efectividad in situ de <i>Beauveria bassiana</i> sobre el control de garrapatas en bovinos. ..	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Taxonomía de las garrapatas .....	6
<b>Figura 2</b> Ciclo de vida de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	10
<b>Figura 3</b> Determinación del grado de infestación parasitaria. ....	37
<b>Figura 4</b> Porcentaje de infestación post aplicación 1.....	39
<b>Figura 5</b> Porcentaje de infestación post aplicación 2.....	40

## ÍNDICE DE ANEXO

<b>Anexo 1</b> Visitas de campo realizadas .....	54
<b>Anexo 2</b> Registro de infección en bovinos .....	55
<b>Anexo 3</b> Análisis en laboratorio .....	55

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con la finalidad de evaluar el uso de *Beauveria bassiana* para control biológico de *Rhipicephalus microplus* en ganado bovino. Se ejecutó previamente un bioensayo en el laboratorio de Microbiología de la carrera de ingeniería agropecuaria de la ULEAM extensión El Carmen, para establecer las concentraciones adecuadas y probar la efectividad patogénica del cultivo disponible. Se utilizó una estadística descriptiva no probabilística. Las variables de estudio fueron la efectividad antiparasitaria (*in vitro* e *in situ*), mortalidad de garrapatas (*in vitro* e *in situ*), tiempo promedio de mortalidad de garrapatas (*in situ*). Se utilizaron tres tratamientos para el experimento *in vitro* T1: solución de  $1 \times 10^8$  conidias/ml; T2:  $1 \times 10^6$  conidias/ml y T3: Agua destilada (testigo) y un total de 150 garrapatas de diferentes estadios de desarrollo, en donde el tratamiento 1 expuso mayor eficacia en las variables de estudio, logrando un 95% de efectividad y produciendo mortalidad significativa de parásitos desde los 10 primeros días. En el trabajo de campo se utilizaron 30 animales (terneros y adultos) que mostraran diferentes grados de infestación (alto, medio y leve), se utilizó la concentración de conidias que se expresó mejor en el bioensayo y se procedió a aplicar el bioensayo con intervalos de 8 días. La respuesta fue significativa desde la primera semana, logrando una reducción de infestaciones graves hasta un 53% en la primera evaluación y una mortalidad hasta del 90% de las garrapatas después de la segunda aplicación al día 16 respectivamente. Se establece que el uso de la *Beauveria bassiana* para control biológico de *Rhipicephalus microplus* en ganado bovino es eficaz.

**Palabras claves:** Parasitosis, sanidad, producción, tratamiento, garrapata.

## ABSTRACT

The present work was carried out with the purpose of evaluating the use of *Beauveria bassiana* for biological control of *Rhipicephalus microplus* in cattle. A bioassay was previously executed in the Microbiology laboratory of the agricultural engineering career of the ULEAM extension El Carmen, to establish the appropriate concentrations and test the pathogenic effectiveness of the available culture. Non-probabilistic descriptive statistics were used. The study variables were the antiparasitic effectiveness (in vitro and in situ), tick mortality (in vitro and in situ), tick mortality average time (in situ). Three treatments were used for the in vitro experiment T1:  $1 \times 10^8$  conidia/ml solution; T2:  $1 \times 10^6$  conidia/ml and T3: Distilled water (control) and a total of 150 ticks of different stages of development, where treatment 1 expressed greater efficacy in the study variables, achieving 95% effectiveness and producing Significant mortality of parasites from the first 10 days. In the field work, 30 animals (calves and adults) were used that showed different degrees of infestation (high, medium and light), the concentration of conidia that was best expressed in the bioassay was used and the bioinput was applied with intervals of 8 days. The response was significant from the first week, achieving a reduction in severe infestations of up to 53% in the first evaluation and a mortality of up to 90% of ticks after the second application on day 16 respectively. It is established that the use of *Beauveria bassiana* for biological control of *Rhipicephalus microplus* in cattle is effective.

**Keywords:** Parasitosis, health, production, treatment, tick.

## INTRODUCCIÓN

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, una especie de garrapata que se adhiere a un solo huésped, prospera en climas tropicales y subtropicales de todo el mundo. Su parasitismo en el ganado tiene un impacto en la economía, causando una disminución en la producción de leche y aumento de peso. Además, estas garrapatas pueden transmitir patógenos que provocan anaplasmosis, babesiosis y antropozoonosis, poniendo en peligro no solo al ganado sino también a la salud humana (Ming et al., 2013).

Las infestaciones de garrapatas han sido durante mucho tiempo un desafío para controlar, dada la escasez de sus depredadores naturales. Como tal, las estrategias de control predominantes implican el uso rutinario de acaricidas químicos. Sin embargo, el uso repetitivo de estos agentes tiene inconvenientes, como la presencia de residuos de medicamentos en consumibles como la carne y la leche, la contaminación y la aparición de cepas de garrapatas resistentes. Para mitigar estos problemas han surgido métodos alternativos de control, como las vacunas contra garrapatas, la promoción de razas bovinas resistentes en las explotaciones ganaderas y las medidas de control biológico (García, 2013).

El uso de hongos entomopatógenos como enemigos naturales de los artrópodos es un aspecto crucial del control de plagas, incluida la lucha contra las garrapatas. Ha habido un impulso reciente para explorar el potencial de los hongos como método biológico para controlar los artrópodos. Los estudios han demostrado la efectividad de *Cordyceps (Beauveria bassiana)* como una solución alternativa para el manejo de *R. (B.) microplus*, un problema que afecta la producción bovina a escala mundial. Investigadores como Paião et al. (2001), Yao y Huang (2004), Ming et al. (2013), Álvarez et al., (2017) y Del Pozo et al., (2018) han dirigido sus esfuerzos hacia esta solución.

Sin embargo, el uso de este hongo como medida de control de *R. (B.) microplus* está restringido debido al limitado conocimiento sobre su efecto sobre este ectoparásito (García, 2013). Cabe destacar que en Ecuador son pocas las investigaciones realizadas para determinar y evaluar el control de este hongo sobre la garrapata *R. (B.) microplus*.

En base a aquella información el presente estudio tiene como objetivo general estudiar el uso de *Beauveria bassiana* para control biológico de *Rhipicephalus microplus* en ganado bovino en El Carmen, provincia de Manabí; cantón reconocido en la actividad ganadera del Ecuador.

Para cumplir con el objetivo del estudio planteado se presenta una metodología experimental, de carácter cuantitativo, y un tipo de investigación de campo donde se realizarán la observación de la funcionalidad de *C. (B.) bassiana* como control biológico de *R. (B.) microplus*, brindando así una alternativa que sea eficaz en la disminución de los daños ocasionados por esta garrapata al interior de las explotaciones bovinas, por lo cual se establece que el estudio presenta una importancia teórica y práctica.

### **Problema científico**

Los ganaderos están lidiando con el desafío de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, que se ha vuelto resistente a muchos acaricidas populares, incluidos deltametrina, fipronil y lactonas macrocíclicas. Los investigadores predicen que el problema solo empeorará con el tiempo (Shyma et al., 2015; Rodríguez et al., 2018). Mientras tanto, la contaminación del medio ambiente y los productos pecuarios debido a los residuos de medicamentos ha hecho saltar las alarmas, alimentando la búsqueda de alternativas más seguras para el control y tratamiento de parásitos (FAO, 2017).

Las garrapatas son responsables de la destrucción de aproximadamente el 80% de la carne de bovino a nivel mundial, con un total de US\$7 billones que se pierden como consecuencia

(Polanco & Ríos, 2016); en países como Colombia, Perú y Ecuador, las pérdidas anuales ascienden a US\$ 25,3 millones aproximadamente (Moya et al., 2018). A pesar de esto, el método predominante para el control de garrapatas en la región es el uso de ixodicidas químicos como piretroides sintéticos y organofosforados, que no solo generan resistencia a los ixodicidas sino que también tienen un impacto ambiental adverso y afectan la calidad y seguridad de los subproductos.

En el Ecuador, la actividad pecuaria juega un papel importante en la economía ecuatoriana, siendo sus productos y subproductos parte de la canasta básica. Sin embargo, la investigación de Guillén y Muñoz (2013) indica que más del 75% del ganado se encuentra en áreas infestadas de garrapatas. Además, el estudio de Pérez y Rodríguez (2019) sobre la resistencia de las garrapatas *Rhipicephalus microplus* a los acaricidas más utilizados en Ecuador donde se revela una tendencia preocupante.

La alfa-cipermetrina, un acaricida popular empleado en Ecuador, ya no es tan eficaz como lo era antes. Estudios recientes han demostrado que ha perdido su potencia frente a *Rhipicephalus microplus*, que ha desarrollado una resistencia del 65,22 % en la Costa y del 63,64 % en el Oriente, según informó Pérez y Rodríguez (2019) y Nava et al. (2021).

Al lado de la problemática de la resistencia y la ausencia de investigación para el desarrollo de nuevas sustancias, en el control químico exclusivo, se han identificado otras fallas importantes, vinculadas a la salud pública, como los residuos en los productos y subproductos de origen animal (carne, leche y derivados de ambos) y al ambiente, como la afectación de organismos no blanco y contaminación de fuentes de agua, entre otros.

En el cantón El Carmen, provincia de Manabí, se ha reconocido por su trabajo ganadero, lugar en el que los métodos de control se enfocan en el uso de químicos, los cuales, tal como se ha explicado anteriormente a llegar resistencia provocando que este ya no sea un método idóneo, por

lo cual se presenta la necesidad del uso de biopesticidas y agentes de control biológico. Se podría establecer como problema de investigación central lo siguiente: ¿El *Beauveria bassiana* para control biológico de *Rhipicephalus microplus* en ganado bovino en el Carmen, provincia de Manabí es un mecanismo de acción efectivo?

A medida que se intensificaron las investigaciones sobre alternativas sostenibles a los productos químicos agrícolas tradicionales, surgió un conjunto de pautas regulatorias que rigen el uso de biopesticidas y agentes de control biológico. Agrocalidad encabezó el esfuerzo y lanzó el “Manual técnico de procedimientos para el registro y control de agentes de control biológico, extractos vegetales, preparados minerales, semioquímicos y productos afines de uso agrícola” el 17 de julio de 2019 (MAG, 2020).

Cercano a el cantón El Carmen en Santo Domingo los aislados de hongos entomopatógenos se han utilizado con éxito para combatir las garrapatas. Los resultados de este método ilustran una tasa de mortalidad impresionante dentro de los cuatro días y una tasa de desprendimiento hasta el noveno día (Bravo & Carranza, 2022)

El objetivo de este estudio es abordar la infestación por garrapatas empleando una mezcla de *Beauveria* spp. y compuestos orgánicos/químicos para combatir las ninfas de garrapata *Rhipicephalus microplus*. El enfoque consiste en rociar la mezcla de acuerdo con la dosis letal promedio (LD50) para lograr un efecto sinérgico entre el hongo y el extracto. Esto permitirá el uso de concentraciones más bajas del hongo, que es más costoso de preparar. Se anticipa que el resultado reducirá sustancialmente las infestaciones de garrapatas.

Se espera que con la elaboración de este trabajo se logre disminuir los impactos negativos como la resistencia a las garrapatas y la contaminación debido a los productos químicos utilizados para combatirla; así como también presentar un base teórica y práctica relevante para futuras

investigaciones.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Estudiar el uso de *Beauveria bassiana* para control biológico de *Rhipicephalus microplus* en ganado bovino en El Carmen, provincia de Manabí.

### **Objetivos específicos**

- Determinar la susceptibilidad de *Rhipicephalus microplus* frente a la exposición de *Beauveria bassiana* en aplicaciones *in vitro*.
- Establecer los niveles adecuados para la utilización *Beauveria bassiana* para control biológico de *Rhipicephalus microplus* en ganado bovino.
- Determinar el efecto antiparasitario de la *Beauveria bassiana* sobre las garrapatas en fase parasitaria en bovinos (ciclo de desarrollo del hongo sobre el insecto, % de mortalidad y promedio de tiempo de mortalidad),

## **Hipótesis**

### **Hipótesis alternativa**

El uso de *Beauveria bassiana* es efectivo para control biológico de *Rhipicephalus microplus* en una población de ganado bovino en el El Carmen.

### **Hipótesis nula**

El uso de *Beauveria bassiana* no presenta efectividad en comparación con otros acaricidas para control biológico de *Rhipicephalus microplus* en una población de ganado bovino en El Carmen.



## 1.2 Biología de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, originario de la India, se ha extendido a varias regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, incluidas Asia, Australia, África y América del Sur y Central. Guglielmone et al. (2003) encontraron que *R. (B.) microplus* se puede encontrar desde el norte de Argentina hasta México y las islas del Caribe. Aunque esta especie se limita a Madagascar y el sureste de África en el subgénero *Boophilus* de África, es abundante en el corredor mesoamericano entre Venezuela y Colombia, así como en el sureste de Brasil y Argentina en América Latina (Estrada et al., 2006).

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es un especie monoxenica, que generalmente se alimenta de abejas. Las larvas se alimentan del pasto en el ganado, lo invaden por 6 a 8 días hasta que sufren la muda para ninfas, que es el momento en el que alcanzan la adultez y se vuelven pestes, durando entre 7 y 9 días. La hembra que fue fertilizada ingresa y se para en el piso para llevar a cabo el oviposición. Los machos permanecen en actividad sexual sobre el hospedero por hasta 70 días. La duración total del parasitismo (desde la primera fase larval que no se alimenta hasta la segunda fase, la hembra que se ingiere) puede variar entre 18 y 22 días, y puede llegar hasta los 30 días.

En la fase de parasitismo, las condiciones climáticas no tienen un efecto notable, en contraste con lo que sucede en la fase no parasitaria, que sí lo tiene. En un clima con una alta humedad relativa y temperaturas entre 24 y 28°C, una hembra que se comió a otra puede transformar hasta el 50 al 60 por ciento de su peso en huevos (entre 2 y 4 mil huevos por hembra), con una tasa de eclosión de 85 y 95 por ciento. Las larvas pueden sobrevivir sin alimento durante más de 30 días en un entorno caliente y más de 120 días en uno frío (Onofrio et al., 2006).

La enfermedad tristeza parasitaria bovina, instigada por protozoarios del género *Babesia* y

bacterias del género *Anaplasma*, se propaga a través del vector *R. (B.) microplus*. Entre las muchas cepas de *Babesia*, *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* se transmiten por vía transovárica desde la hembra hinchada hasta los huevos. Las larvas están infectadas con *Babesia bovis*, mientras que las ninfas y los adultos son los portadores de *Babesia bigemina* (Guglielmone et al., Editorial Butantan).

### **1.3 Características relevantes para la identificación de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

El suborden Ixodida (Metastigmata) comprende aproximadamente 870 especies de garrapatas, divididas en tres familias. Dentro de la familia Ixodidae, se pueden encontrar garrapatas duras, con aproximadamente 683 especies identificadas (Estrada et al., 2006). Guglielmone et al. (2003) destaca que el subgénero *Boophilus* alberga solo dos especies que se encuentran en América Latina: *R. (B.) microplus* y *R. (B.) annulatus*. Mientras que el primero está muy extendido, el segundo se limita a la región mediterránea del Nuevo Mundo y el noreste de México, y aún no se ha descubierto en la región neotropical.

Morfológicamente, las especies de la familia Ixodidae son reconocidas por poseer capítulo localizado siempre posteriores (que es visible desde la parte dorsal) y escudos dorsales en todas las etapas de desarrollo. La diferencia sexual es marcada (el escapón es pequeño y bajo en hembras, larvas y ninfas, no llega a la región media del cuerpo; en cambio, en los machos el escapón es grande y llega hasta la parte posterior). En las hembras se percibe una zona permeable, el hipostoma está dentado en la mayoría de los géneros, excepción hecha de un par de ellos, en ninguno de ellos se hallan crenulaciones. El último artículo o segmento del palpo de la pata IV se encuentra en posición ventral, se localiza en una cavidad en la extremidad distal del artículo III. Las placas espiriculares se ubican posterior a la pata IV. Todos los especímenes de *Rhipicephalus*

tienen un color castaño a rojizo en el escudo, este no tiene decoraciones y presenta ojos y una cara de tamaño reducido, además, la base del caparazón es hexagonal. Los machos poseen de 2 a 4 placas adanales y en algunos casos tienen un apéndice caudal.

Las diferencias morfológicas que la distinguen de otras especies son la presencia de una cola en el macho, la cantidad de espinas en la coxa I es abundante en las hembras, el capítulo es más corto, los palpos son más cortos que el hipostoma y en ocasiones tienen dientes de 5/5 o 4/5, no existen placas espiriculares, las presentes son ovales y se encuentran en ambos sexos hasta 4 veces, además, en los machos existe una gran cantidad de placas adanales.

#### **1.4 Ciclo de vida**

El artrópodo hemimetábolo *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* requiere una dieta de fluidos sanguíneos durante todo su ciclo de vida. La alimentación de la garrapata comienza aferrándose a un huésped, perforando su piel con quelíceros o estructuras bucales y anclándose al tejido de la piel con un órgano hipostoma situado en su capitulum (Benavides et al., 2016).

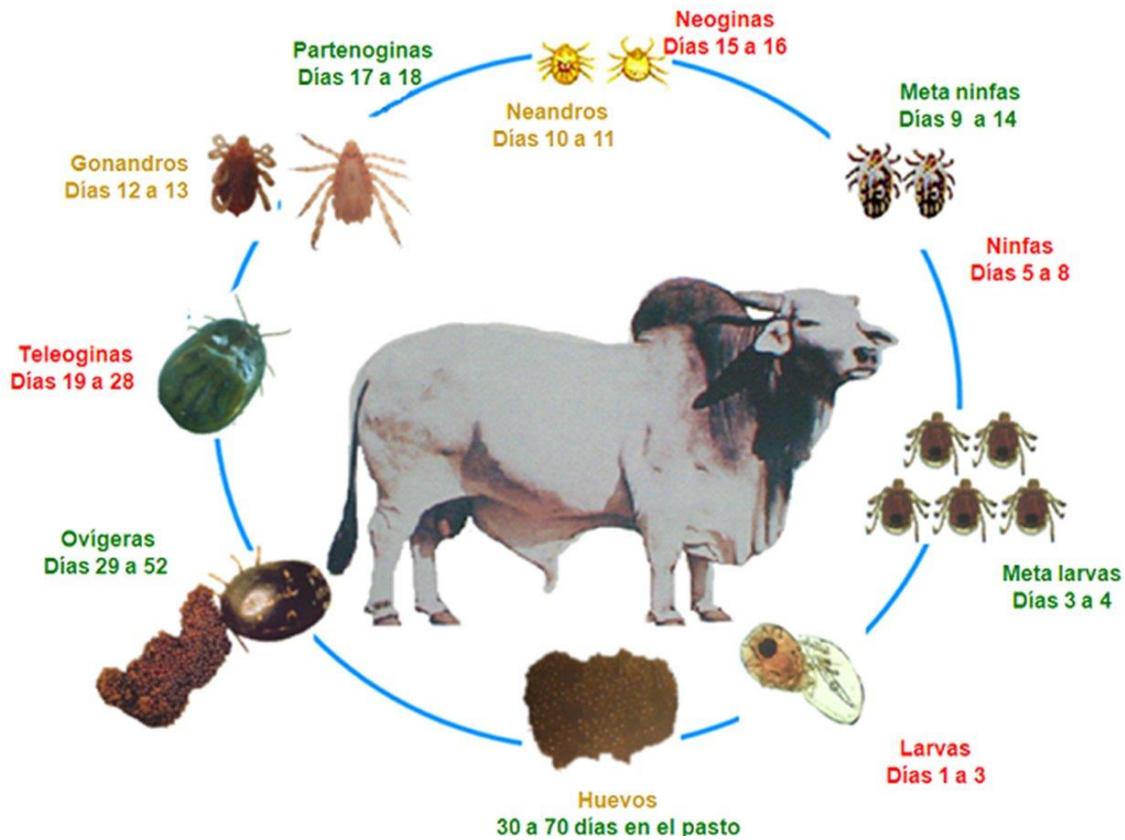
El ciclo de vida de las garrapatas comprende cuatro etapas de desarrollo: el huevo, la larva de seis patas, la ninfa de ocho patas (que es sexualmente inmadura) y el adulto de ocho patas (que es sexualmente maduro). La garrapata pasa a la etapa final después de separarse del huésped, (Cortinas & Jones, 2006). Por lo general, una garrapata hembra se alimenta durante 19 a 25 días antes de llenarse de sangre y caer al suelo para comenzar la oviposición. Durante esta etapa, la garrapata puede poner hasta 3.000 huevos (Benavides et al., 2016).

El ciclo de vida de la garrapata en su huésped permanece invariable, y el desarrollo tiene lugar en los pastos y está dictado por la temperatura del suelo. Las temperaturas óptimas para la etapa de huevo a adulto oscilan entre 24 °C y 28 °C, lo que lleva a un período de desarrollo más corto de alrededor de 30 días. Sin embargo, las temperaturas más frías pueden extender

significativamente esta fase (Benavides et al., 2016).

**Figura 2**

*Ciclo de vida de Rhipicephalus (Boophilus) microplus*



Fuente: Imagen obtenida de la publicación realizada por (Servicios Ganaderos, 2016)

### 1.5 Ecología Parasitaria de *Rhipicephalus microplus*

*Rhipicephalus microplus* se encuentra presente en zonas de clima tropical y subtropical, así que se han encontrado registros sobre los 2600 metros sobre el nivel del mar. En Ecuador, la información sobre las garrapatas es escasa, por lo que no se conocen datos relevantes que hablen sobre su ecología o población. La especie tiene la particularidad de contar con una fase diapausada en su ciclo biológico que depende del hospedero, para poder encontrarlo, utiliza sus sentidos que responden al NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> y al calor corporal (SENASA, Garrapatas, 2006).

Las garrapatas se observan con frecuencia en regiones con precipitaciones constantes,

clima cálido y alta humedad, ya que proporcionan el caldo de cultivo perfecto para múltiples generaciones de garrapatas. Por el contrario, la población de garrapatas en áreas que experimentan fluctuaciones en las estaciones lluviosa y seca es inestable e impredecible (SENASA, Garrapatas, 2006).

**Tabla 1**

*Garrapatas Reportadas en Ecuador*

<b>Familia</b>	<b>Especie</b>
Ixodidae	<i>Amblyomma maculatum</i>
	<i>Amblyomma cajennense</i>
	<i>Amblyomma naponense</i>
	<i>Amblyomma multipunctum</i>
	<i>Amblyomma triste</i> <i>Anocentor nitens</i>
	<i>Ixodes boliviensis</i>
	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>
	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
Argasidae	<i>Ornithodoros furcosus</i>
	<i>Ornithodoros talaje</i>

Fuente: Información adaptada del trabajo realizado por (Voltzit, 2007)

Ecuador es un país tropical que posee condiciones climáticas que son propicias para las garrapatas, en la parroquia San José de Alluriquín, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, se encontraron *Rhipicephalus microplus* con un 97,53 %, *Amblyomma* 2,25 % e *Ixodes* 0,21 % (Guillén & Muñoz, 2013). En Ecuador existen más de 40 especies de los gneros *Amblyomma* spp., *Dermacentor* spp., *Haemaphysalis* spp., *Ixodes* spp., *Rhipicephalus* spp., documentadas por ser relevantes para la veterinaria y la medicina (Tipás, 2020).

### **1.6 Impacto económico del *Rhipicephalus microplus***

Los efectos económicos de los ectoparásitos se distribuyen directa e indirectamente, con

correlación con la epidemiología. Las pérdidas directas son directamente proporcionales a la incidencia de la enfermedad, que aumenta con la población de garrapatas y los animales parasitados que la contraen. El impacto negativo se evidencia cuando la población se multiplica con el primer encuentro con hemoparásitos (Benavides et al., 2016).

Los animales vulnerables se ven afectados de manera directa por la pérdida, se puede observar mortalidad, también se afecta el crecimiento y surgen abortos en el último periodo de gestación, se daña la piel y se afecta la conducta, además, se ve disminuido el bienestar animal (Tipás, 2020).

### **1.7 Métodos de control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

El control de *R. (B.) microplus* en el sur y centro del continente americano es un desafío importante en la producción bovina. Aunque el ganado bovino es su huésped preferido, estas garrapatas también pueden infestar caballos, ovejas, cabras, venados y otros animales (Castro-Silva et al., 2009). Los métodos de control tradicionales se han basado en gran medida en los acaricidas sintéticos, que se aplican en dosis y modalidades variables (Vargas et al., 2003; Rodríguez et al., 2012). Sin embargo, el uso continuado de estos agentes químicos ha provocado el desarrollo de resistencia a los organofosforados y piretroides, lo que preocupa mucho a los agricultores (Patarroyo et al., 2009). Como resultado, investigadores de varias regiones han estado investigando métodos alternativos de control de garrapatas, como agentes biológicos entomopatógenos como hongos o extractos de plantas (Ojeda-Chi et al., 2010; Rosado-Aguilar et al., 2010).

#### **1.7.1 Control químico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.**

Hasta ahora, el control de garrapatas se ha llevado a cabo utilizando productos de los grupos de organofosforados, piretroides sintéticos, amidinas y macro lactonas (ML) (Rodríguez et al.,

2012). La capacidad de algunos de estos productos para disminuir la cantidad de garrapatas en los animales se ha visto limitada por el desarrollo de una plaga resistente, la eliminación de organismos que no son el objetivo, como los agentes de control biológico, problemas de contaminación ambiental y, aún peor, la contaminación por residuos de plaguicidas en la leche y la carne (Graf et al., 2004). Según la FAO (2016), en India, las especies de garrapatas han desarrollado la capacidad de tolerar todos los productos químicos acaricidas comúnmente usados.

### **1.7.2 Control biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

El impacto peligroso del uso de químicos en las garrapatas ha llevado al establecimiento de técnicas de control alternativas. Estos incluyen la implementación de bioagentes que comprenden nematodos (Broglia et al., 2012) y hongos entomopatógenos como *Cordyceps (Beauveria)* y *Metarhizium* (Pacheco et al., 2019).

El control biológico es una práctica agrícola que se ha incrementado de manera significativa, su objetivo es la destrucción total o parcial de los patógenos e insectos plaga, a menudo, esto se logra a través del uso de sus depredadores naturales (Molano et al., 2022). Se han documentado numerosos reportes sobre el empleo de microorganismos que causan la muerte de insectos, los cuales, por su capacidad de provocar enfermedad y muerte en estos, son llamados agentes biológicos para el control de plagas (Bautista et al., 2021). Los hongos son los únicos microorganismos en el mundo que tienen un mecanismo único de invasión, lo cual les permite penetrar directamente a través de la cutícula o pared del tracto digestivo de un insecto, lo que los hace excelentes agentes de control biológico que actúan como insecticidas de contacto.

Actualmente se han presentado soluciones alternativas para combatir *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* han salido a la luz a través de diversos estudios, entre ellos el uso de aceites esenciales de plantas (Vinturelle et al., 2017; Castro et al., 2018), así como agentes de biocontrol

a base de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*.

Por lo tanto, el hongo *C. (B.) bassiana* se presenta como una potencial medida de control biológico. Su eficacia en la lucha contra los patógenos agrícolas y ganaderos a nivel mundial ha sido estudiada y establecida. Sin embargo, su uso como medida de control de *R. (B.) microplus* es limitado debido a la falta de conocimiento sobre su impacto en este ectoparásito (Fernández et al., 2010).

### ***1.7.3 Resistencia a Acaricidas del *Rhipicephalus microplus****

Los acaricidas son la opción para controlar las garrapatas. Los grupos químicos comúnmente empleados incluyen amidinas, fluazurón, organoclorados, piretroides sintéticos y lactonas macrocíclicas, según un estudio de Rodríguez-Vivas et al. (2014). En Ecuador, la ivermectina, alfa-cipermetrina y amitraz dominan el mercado de productos para el control de garrapatas, según lo informado por EDIFARM (2017).

AGROCALIDAD (2016) ha prohibido el uso de organoclorados, carbamatos y organofosforados, ya que son extremadamente tóxicos y pueden dañar tanto al manipulador como al animal.

La resistencia a las garrapatas es una adaptación de supervivencia que hace que la dosis letal habitual sea ineficaz. Para evitar la exposición al acaricida, las garrapatas utilizan varios mecanismos de resistencia, como la migración a áreas libres de químicos, resistencia metabólica que permite una metabolización química más rápida y cutículas impermeables que evitan el contacto directo del acaricida con el interior de la garrapata (Herrera & Romero, 2022). Estos mecanismos han sido ampliamente estudiados y documentados como efectivos en la supervivencia de las garrapatas.

Los factores externos que causan la resistencia se derivan de cómo los humanos manejan

los acaricidas, incluida la frecuencia, la dosis y el método de administración. Además, el tipo de acaricida seleccionado y las prácticas de manejo de la finca también pueden contribuir a la resistencia (Avellaneda et al., 2020).

Un estudio realizado en Ecuador revela que ciertas regiones presentan mayores porcentajes de resistencia a diversos acaricidas. En el Oriente, el amitraz muestra una tasa de resistencia del 86,4%, mientras que la Costa presenta un 73,9% y un 65,2% de resistencia a la ivermectina y alfacipermetina, respectivamente. La prevalencia de resistencia a amitraz en fincas ecuatorianas es de 71,9%, encontrándose 69,8% y 63,5% de resistencia en ivermectina y alfacipermetrina (Rodríguez et al., 2020).

## **1.8 Hongos entomopatógenos**

Su tarea actual es regular el crecimiento de artrópodos, plagas y organismos parásitos que pueden resultar en daños económicos en una variedad de campos, incluida la agricultura y la ganadería. Entre los biocontroladores, los hongos entomopatógenos son altamente efectivos, siendo *Metarhizium*, *Cordyceps (Beauveria)*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium* los más destacados por su potencial (Salari et al., 2008).

Para lograr el control biológico es necesario eliminar o reducir la presencia de patógenos e insectos plaga. Un método eficaz es mediante el uso de hongos entomopatógenos, que pueden infectar a los artrópodos al penetrar en sus cutículas. Estos hongos emplean varios mecanismos de acción que evitan que las víctimas desarrollen resistencias (Herrera & Romero, 2022).

La utilización eficiente de aspectos ecológicos como la virulencia, el grado de patogenicidad y los huéspedes requiere un conocimiento adecuado de la humedad relativa y la temperatura. La investigación profunda, que abarque patología, genética, ecología y fisiología, así

como técnicas de producción, formulación y aplicación en masa, es imprescindible para el uso óptimo de estos factores (Herrera & Romero, 2022).

## **1.9 Cordyceps (*Beauveria*) bassiana**

El hongo *Cordyceps (Beauveria)* está clasificado como Deuteromycete y cae dentro del reino Fungi, División Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales y Familia Cordycipitaceae. Presenta micelio blanco, conidióforos sencillos, pueden estar agrupados, los conidios son hialinos, redondos y tienen un tamaño de 3-6  $\mu\text{m}$  de largo por 2,5-3,5  $\mu\text{m}$  de ancho (García, 2013). A 20 °C, las colonias de este hongo crecen entre 0,6-2,3 cm en tan solo ocho días. Hay varios tipos de células presentes en los abundantes conidióforos, incluidas las células fialídicas, las células conidiógenas globosas y las células en forma de botella; genera colonias primero de color blanco y luego se tornan de un color amarillo-rosado presentando apariencia polvorosa. Para la germinación de conidios se requiere una temperatura de 25-30 °C y un pH de 5,7- 5,9 (García, 2013).

Estudios *in vitro* han revelado la efectividad de este hongo, ya que puede causar la muerte de todos los estadios larvarios en 18 días a una concentración de  $5 \times 10^9$  conidios/ml (Rebaza et al., 2020). Incluso las garrapatas altamente resistentes han mostrado altas tasas de mortalidad y reducción de la oviposición a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml (Soracá et al., 2021). Además, los estudios de toxicidad de *B. bassiana* en ratones han demostrado su inocuidad a nivel respiratorio, ocular, sistémico y dérmico. Como tal, podría ser una solución eficaz y segura tanto para humanos como para animales domésticos.

### **1.9.1 Mecanismo de acción**

Hasta la fecha se han descrito más de 750 especies de hongos entomopatógenos y continúa el aislamiento de nuevas cepas. Las más utilizadas a nivel mundial son *Metarhizium anisopliae*

(33,9%), *Beauveria bassiana* (33,9%), *Isaria fumosorosea* (anteriormente conocida como *Paecilomyces fumosoroseus*) (5,8%) y *Beauveria brongniartii* (4,1%) (De Faria & Wraight, 2007).

La enfermedad de los insectos se desarrolla en tres etapas: (1) adhesión y germinación de esporas en la cutícula del insecto, (2) penetración en el hemocoel y (3) desarrollo de hongos, que por lo general resulta en la muerte.

### **1) Adhesión de la spora a la cutícula del hospedero y germinación de la spora**

El primer encuentro entre entomopatógenos e insectos ocurre cuando las esporas de los primeros se adhieren a la superficie de los segundos. El proceso de adhesión ocurre en tres etapas consecutivas: adsorción de las esporas a las superficies por reconocimiento de receptores específicos de las propiedades de las glicoproteínas en los insectos, adhesión o consolidación de la interfase entre las esporas pregerminadas y la cutícula, y finalmente, la germinación y desarrollo hasta la formación de células adheridas para iniciar la fase osmótica (Tanada & Kaya, 1993; Pedrini et al., 2007).

El proceso por el cual las esporas se adhieren a la cutícula del insecto está mediado por moléculas sintetizadas por el hongo llamadas adhesinas. En el entomopatógeno *Metharizium anisopliae* se ha descrito una adhesina denominada MAP1, que se localiza en la superficie de las conidias. La expresión heteróloga de MAP1 en *Saccharomyces cerevisiae* dota a la levadura de propiedades adhesivas específicas para cutículas de insectos. La interrupción del gen que codifica MAP1 afecta la germinación y formación de blastosporas y, de la misma manera, reduce en gran medida la virulencia fúngica (Wang & Leger, 2007). Por otro lado, se ha demostrado que los iones divalentes como  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  reducen la repulsión electrostática y promueven la adhesión de esporas (Pucheta et al., 2006).

## 2) Penetración en el hemocele

La investigación de Charnley de 1992 sugiere que la capacidad de los hongos entomopatógenos para penetrar insectos depende de las características de la cutícula. Las sustancias antifúngicas y nutricionales, así como factores como el grosor y la esclerotización, juegan un papel en el proceso.

Una vez que tiene lugar la adhesión, el hongo puede penetrar a través de los esfuerzos químicos y físicos combinados. Un haustorio, una estructura fúngica, aplica presión hasta que la cutícula se deforma y las áreas escleróticas y membranosas de la cutícula se rompen poco después. Junto con este mecanismo, la acción enzimática contribuye al proceso. Las proteasas, lipasas y quitinasas utilizan principalmente actividades hidrolíticas para degradar el tejido que rodea el área de penetración, facilitando la entrada del hongo (Téllez et al., 2009). Otros estudios in vitro sugieren que la digestión sigue una secuencia de lipasa-proteasa-quitinasa (Tanada & Kaya, 1993), con la secreción de ácidos orgánicos, como el ácido oxálico, que potencialmente ayuda a la acción enzimática.

La virulencia de *Metharizium anisopliae* depende de la proteasa Pr1, que puede acelerar la desaparición de *Manduca sexta* en un 25 % si se sobre expresa, en comparación con las infectadas con el genotipo salvaje (St. Leger et al., 1996). Asimismo, la sobreexpresión del gen de la quitinasa de *Beauveria bassiana* puede acelerar la mortalidad de insectos en un 23% (Fan et al., 2007). Estos hallazgos resaltan el papel crucial de las enzimas hidrolíticas en la virulencia de los hongos entomopatógenos y pueden ayudar en la selección de cepas superiores para la formulación de insecticidas biológicos.

Los hongos emplean una táctica adicional para infiltrarse en el hemocele del insecto: la entrada a través de aberturas externas como la cavidad oral y los espiráculos. La humedad del

tracto alimentario proporciona una atmósfera favorable para la germinación de las esporas, pero las secreciones digestivas pueden dificultar este proceso o incluso comprometer la hifa germinativa.

### 3) Replicación en el hemocele

Después de la penetración en el hemocele, muchos hongos experimentan un cambio dimórfico de micelio a levadura. Dada su capacidad para evadir el sistema inmunológico del insecto, es probable que ocurra septicemia.

La fisiología del insecto sufre una serie de síntomas anormales al contraerse la micosis, que pueden incluir falta de coordinación, convulsiones, parálisis y conductas alteradas. La fatalidad se produce por varios factores, como la pérdida de líquidos que lleva a la deshidratación de las células, el daño físico a los tejidos y el consumo de nutrientes, además de la toxicosis (Bustillo, 2001)

Después de penetrar en el insecto, los hongos deben enfrentarse a los mecanismos de respuesta del sistema inmunitario. Para hacerlo, han perfeccionado estrategias defensivas e inmunosupresoras, incluida la producción de toxinas y la alteración de la estructura de su pared celular. El campo de la patología de insectos se centra en gran medida en la producción de toxinas de hongos entomopatógenos. La investigación de patógenos de insectos ha llevado al aislamiento de un número significativo de metabolitos secundarios de bajo peso molecular (ver Tabla 2), algunos de los cuales exhiben propiedades insecticidas modestas (Gillespie & Claydon, 1989).

**Tabla 2**

*Principales metabolitos producidos por hongos entomopatógenos*

<b>Clasificación</b>	<b>Hongos que la producen</b>
Beauveria tenella, B. bassiana	No peptídicas

B. tenella	Oospereina
B. bassiana	Tenellina
Beauveria, Verticillium, Metarhizium	Bassianina
Fusarium	Ácido oxálico
Beauveria, Paecilomyces, Verticillium	Ácido fusárico
Paecilomyces tenui pes	Ácido dipicolínico
	Paecilomincinas
Peptídicas lineales	Paecilomyces
Leucinostinas	Tolypodadium
Efrapeptinas	
Peptídicas cíclicas	<i>B. bassiana, Paecilomyces</i>
Bcuvericina	<i>B. bassiana, Paecilomyces</i>
Beauverólidos	Metarhizium
Destruxinas	Fusarium
Eniatinas	Metarhizium
Ciclosporinas	

Fuente. Información adaptada del estudio realizado por (Gillespie & Claydon, 1989)

Aunque menos examinada, se ha registrado la potencia insecticida de varias macromoléculas basadas en proteínas. Los ejemplos incluyen las proteínas melanizantes de *B. bassiana*, que han sido estudiadas por Fuguet et al., (2004), glicoproteína de *B. sulfurescens* detallada por Mollier et al., (1994), e hirsutellina extraída de *Hirsutella thompsonii* que se sabe que es insecticida según Wei-Zhen et al., (1995) Estos metabolitos producidos por los hongos pueden provocar la mortalidad de los insectos al afectar las células especializadas del sistema inmunitario y restringir su ataque a las estructuras invasoras de los hongos.

Se sabe que los hongos burlan los sistemas inmunológicos de los insectos al evitar la formación de paredes celulares y desarrollarse en protoplastos, que evaden la detección por los

hemocitos circulantes en el hemocoel (Téllez et al., 2009). Una vez que los nutrientes del insecto, particularmente las fuentes de nitrógeno, comienzan a disminuir, las fases de levadura vuelven a su crecimiento micelial, como lo demuestra *Entomophthora thripidum*. Las hifas del hongo emergen posteriormente fuera del cadáver del insecto cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables, dando lugar a la esporulación. Aunque la esporulación típicamente ocurre en cadáveres, no es poco común en insectos vivos.

La forma en que las esporas se dispersan depende en gran medida de las características de la spora y el esporangio, y puede llevarse a cabo de forma pasiva o activa. Los mecanismos de dispersión pueden implicar la adhesión o la transferencia de un invertebrado a otro (Téllez et al., 2009).

### **1.9.2 Efecto Golpe**

La aplicación de hongos entomopatógenos junto con dosis reducidas de productos químicos, han demostrado en diversas investigaciones, que existe sinergismo, potenciación y buena interacción; dando como resultados que esta combinación tenga efectos superiores que la suma de los efectos individuales (Cazorla & Morales, 2010).

En el caso particular de la enfermedad del mal de Chagas, comúnmente se usan insecticidas químicos para su control, en un inicio se usó productos organofosforados y posteriormente piretroides. Las epizootias que se han presentado después de usar insecticidas, han dado la idea de plantearse una alternativa de control, en la cual se usan subdosis de insecticidas, que debilitan o estresan al insecto, tornándolo más susceptible, en este caso a los hongos entomopatógenos, que tienen la particularidad potencial para el control de este insecto (Alazogaray et al., 1998).

Alazogaray et al., (1998) evaluó el efecto de la deltametrina (piretroide) en la germinación y virulencia de *Beauveria bassiana* sobre *Triatoma infestans* (vector de la enfermedad de Chagas),

donde se comprobó que el porcentaje de germinación de conidios disminuye en función de las concentraciones altas del piretroide, en cuanto a la virulencia del hongo, al exponer ninfas de *T. infestans* a concentraciones bajas del químico, no hubo alteración significativa.

Dentro de la compatibilidad de *Beauveria bassiana* con químicos para el control de plagas de Triatominae, se evaluó la efectividad de piretroides (cipermetrina, deltametrina) y organofosforados (Malatión, fenitroato) en dos concentraciones, siguiendo las indicaciones de la compañía, la germinación fue reducida en más del 90% en todos los tratamientos; en la mitad de la dosis recomendada, la deltametrina fue la que mostró mayor compatibilidad, sin embargo, no todos los aislamientos del hongo reaccionaron de la misma manera; la Cipermetrina en ambas concentraciones, reflejó la mayor inhibición, debido a su alto grado de esporocida (Cazorla & Morales, 2010).

### **1.9.3 Bioensayos**

El bioensayo implica el uso de organismos vivos para detectar compuestos químicos o efectos ambientales en una superficie. Este método es crucial debido a la capacidad de los organismos vivos para identificar niveles de concentración bajos indetectables por métodos analíticos. Además, este método evalúa el daño biológico causado al ecosistema durante y después de la exposición, lo que lo convierte en un enfoque efectivo para evaluar los riesgos ambientales (Correa, 2006).

Observar el impacto en los organismos a través del monitoreo es inmensamente útil en una variedad de escenarios. Esto incluye analizar la efectividad de un proceso de remediación, examinar el cumplimiento de los parámetros de calidad ambiental y medir los efectos antes y después de una dosis compuesta. Los conocimientos obtenidos de estas actividades de monitoreo facilitan las decisiones relacionadas con el desarrollo y la comercialización de nuevos productos,

la evaluación de riesgos ambientales y más (Correa, 2006).

Antes de decidir utilizar cualquier sustancia o compuesto, es fundamental evaluar primero su potencial a través de un bioensayo. Estas pruebas pueden arrojar resultados tanto positivos como negativos y se emplean comúnmente para determinar el potencial tóxico de un nuevo producto. En un bioensayo, se expone un organismo a una sustancia en particular y se evalúan meticulosamente las lesiones o daños resultantes. La muerte se considera como una medida crítica de letalidad o mortalidad, tal y como señalan Ávila et al. (2019).

Los bioensayos in vitro se basan en una variedad de organismos como modelos, incluidas células, plantas, insectos, microorganismos y otras formas de vida complejas.

Los insectos son objeto de un intenso escrutinio, ya que se sabe que son portadores de enfermedades en humanos, animales y plantas. Un buen ejemplo son las garrapatas del ganado, que causan importantes pérdidas económicas debido a las enfermedades que transmiten. Para evaluar los efectos antiparasitarios de productos comerciales convencionales o extractos de plantas, los bioensayos se basan en el control de la supervivencia, la reproducción y la mortalidad. Los investigadores han realizado numerosas investigaciones para determinar la eficacia de estos métodos.

Mediante los experimentos de bioensayo se puede calcular concentraciones que muestren algún efecto significativo en el organismo vivo. Por ejemplo, se calcula la letalidad o mortalidad, la concentración necesaria para matar al 50% de los organismos se denomina Concentración letal 50% (CL50); esta permite comparar diferentes sustancias, cuando se busca el efecto de la mortalidad en un organismo, se espera que esta se manifieste a la menor concentración (Ávila et al., 2019).

## CAPITULO II

### 2 INVESTIGACIONES EXPERIMENTALES AFINES AL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Aunque el control de garrapatas químico es efectivo, se ha visto disminuido parcialmente debido a que su utilización origina problemas de contaminación de la leche y la carne, ya que su toxicidad afecta a los animales y a las personas, así como al medio ambiente. Además, se han registrado casos de poblaciones de garrapatas que son resistentes a los acaricidas químicos, lo que ha llevado a que los productores incrementen el número de aplicaciones anuales y la dosis, lo que se traduce en un aumento en los costos enfocados en el control de las garrapatas (Rodríguez et al., 2012)

Varios estudios han demostrado la eficacia de *C. (B.) bassiana* en el control de poblaciones de garrapatas Ixodidae, ya sea desplegando tratamientos basados únicamente en el hongo (Abdigoudarzi et al., 2009), o combinándolo con otros productos biológicos como *Metarhizium anisopliae* (Kaaya & Hedimbi, 2012).

Estudios científicos como el de Fernández et al., (2010) indican que *C. (B.) bassiana* se presenta como una alternativa confiable para el control de *R. (B.) microplus*, con reducciones significativas en los porcentajes de oviposición y eclosión, así como efectos patogénicos en garrapatas adultas. Esto se ha observado a través de varios tratamientos biológicos combinados y tratamientos que utilizan únicamente el hongo.

Delgado y Murcia (2011) en su estudio explican que *C. (B.) bassiana* es un control biológico altamente efectivo para las plagas agrícolas en Colombia, incluidas aquellas que plagan cultivos como el café y el maíz. Su uso ha llevado a menores costos de producción, por lo que es una opción popular. Sin embargo, en el ámbito ganadero, falta información sobre la eficacia del

hongo en el control de la garrapata *R. (B.) microplus*. Es importante que se realicen más investigaciones para aclarar cómo se puede utilizar este hongo en los sistemas de producción bovina.

Siguiendo un mismo enfoque, García (2013) realizó un estudio para evaluar la eficiencia de *Cordyceps (Beauveria bassiana)* en el control de la población biológica de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* mediante métodos *in vitro*. Se recolectaron garrapatas hembras adultas de bovinos de la provincia Ricaurte del departamento de Boyacá con un peso de 0.200-0.250 gramos. Se utilizó la técnica de inmersión de 60 segundos de Drummond con tres concentraciones diferentes de hongo: 10<sup>4</sup> esporas/ml, 10<sup>6</sup> esporas/ml y 10<sup>8</sup> esporas/ml. El cuarto tratamiento involucró agua destilada como control. La concentración de 10<sup>8</sup> esporas/ml demostró los resultados más prometedores, con presencia de micosis del 100 %, mortalidad completa (30/30), oviposición limitada (40,33 %) y porcentaje de eclosión de huevos disminuido (24,33 %). Los resultados exitosos de *C. (B.) bassiana* en *R. (B.) microplus*, como se demostró en el estudio, ofrecen un nuevo enfoque viable para abordar los problemas relacionados con las garrapatas en la cría de bovinos.

También, el objetivo del estudio de Oporta (2017) fue evaluar el potencial de los hongos entomopatógenos en el control de la garrapata del ganado, *Rhipicephalus microplus*. Se evaluaron tres hongos - *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* e *Isaria fumosorosea* - por su capacidad para causar mortalidad y reducir el parasitismo en *teleogyns de R. microplus*, en condiciones de laboratorio. Se realizó un bioensayo para determinar la concentración más efectiva de 1x10<sup>8</sup> conidios/ml y se utilizó el método de inmersión para inocular las garrapatas. El hongo que mostró la mayor promesa se aisló de los *teleogins* parasitados y se caracterizó utilizando descriptores morfológicos. Para los bioensayos posteriores se estableció un diseño completamente al azar con

6 tratamientos y 5 repeticiones. Los muestreos se realizaron cada 24 horas y se registró el número de teleóginas vivas, muertas, ovipositantes y con signos de micosis. Los resultados mostraron que *M. anisopliae* causó la mayor mortalidad y parasitismo por teleógina, mientras que *I. fumosorosea* tuvo el efecto más bajo. El menor parasitismo se encontró en *C. bassiana*. *M. anisopliae* demostró la LC50 más baja, mientras que *I. fumosorosea* tuvo la más alta, con *C. bassiana* en algún punto intermedio. Aunque el TL50 de *I. fumosorosea* superó al de *M. anisopliae*, no alcanzó al de *C. bassiana*.

En la investigación de Galindo (2016) se evaluó el efecto patógeno del hongo *Beauveria bassiana* (Ascomycota) a diluciones de  $1 \times 10^4$ ;  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$  conidias/mL sobre la viabilidad y la reproducción de la garrapata *Rhipicephalus microplus* (Arachnida: Ixodida, Ixodidae) resistente a ixodicidas. La eficacia de mortalidad encontrada para Cipermetrina (CP) fue de 41,8%, Amitraz (AM) 66,7% y Triclorfon (TR) de 100%; se encontraron correlaciones positivas donde TR se correlacionó positivamente, AM y CP se correlacionaron negativamente. Los bioensayos mostraron mortalidad entre 95,26% y 98,43% a partir del día (d) 10, e invasión fúngica en el 77% de la población evaluada a partir del día 8. Los parámetros reproductivos disminuyeron después de la infección, el desove disminuyó entre un 23,4 % y un 47,2 %; la eficiencia de eclosión disminuyó entre un 16,3 % y un 79,3 %. Los resultados mostraron menor sensibilidad a AM y CP y mayor sensibilidad a TR. Las garrapatas susceptibles a TR también lo fueron a *B. bassiana*, mientras que las garrapatas con mayor supervivencia al químico tuvieron menor supervivencia al hongo. La cepa BbF2011 del hongo *B. bassiana* se puede considerar como un control biológico potencial de *R. microplus* y debería servir como un elemento importante en el manejo integrado de garrapatas resistentes a los ixodicidas.

Persiguiendo el mismo objetivo, Nunes et al., (2019) tuvo el propósito fue medir la eficacia

de tres concentraciones diferentes (107, 108 y 109 conidios/mL) de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en el control de adultos de *Rhipicephalus microplus*. El estudio empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x3, con cinco repeticiones. Cada experimento estuvo compuesto por cinco cajas de Petri, cada una con diez individuos de *R. microplus* colectados manualmente de bovinos en el municipio de Freites del estado Anzoátegui. Las garrapatas se rociaron con hongos antes de la incubación durante 14 días a  $27,5 \pm 1^\circ\text{C}$  y 85% de humedad relativa. Los resultados indicaron que *M. anisopliae* y *B. bassiana* tuvieron un impacto significativo en la mortalidad de *R. microplus* *theologines*, con 84% y 77,33% de efectividad, respectivamente. Entre los dos aislamientos de hongos probados, *Metarhizium anisopliae* superó a *B. bassiana* en términos de efectividad. La concentración de 109 conidios/mL resultó ser la más potente, logrando una tasa de mortalidad del 89,02% y una eficacia del 88,23%. Ambos aislamientos fúngicos redujeron el porcentaje de eclosión, con *Metarhizium anisopliae* causando una reducción del 21,87 % mientras que *B. bassiana* provocó una reducción del 27,37 %.

Finalmente se presenta el trabajo de Agudelo et al., (2021) quienes realizaron una revisión sobre los hongos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma spp* como biocontrol de la garrapata *Rhipicephalus microplus*. Los investigadores utilizaron el programa Mendeley donde se manejó 90 referencias y posteriormente se realizó un análisis estadístico simple teniendo en cuenta el estadio de la garrapata, la concentración de la suspensión fúngica utilizada, el método de aplicación, el tipo de estudio (in vivo/in vitro) y el país en el que se realizó. Se encontró que, en comparación con *Trichoderma*, *B. bassiana* y *M. anisopliae* han sido las más estudiadas en términos de control biológico, debiéndose considerar las condiciones ambientales y características del hongo y las garrapatas para su efectividad, lo que finalmente permite su consideración como insectos viables patógeno.

## CAPÍTULO III

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Localización de la unidad experimental

El estudio de campo donde se aplicó en tres frecuencias el hongo *Beauveria bassiana* como control biológico de *Rhipicephalus microplus* en ganado bovino fue en la Hacienda “Justo Juez” ubicada a aproximadamente 30 minutos del Cantón El Carmen. Del mismo modo, se empleó el estudio de campo en este lugar para poder establecer los costos de control de garrapatas con tres frecuencias de aplicación del hongo.

Para reconocer la efectividad hongo *Beauveria bassiana* como control biológico de garrapatas en el ganado se realizó una prueba de susceptibilidad de la garrapata *Rhipicephalus microplus* y se estimó la Dosis Letal Media (DL50) de *Beauveria bassiana* en las instalaciones del Centro de Investigación y Reproducción de Control Biológico, ubicado en el Campus agropecuario de la granja experimental (ULEAM), Ubicada en km 33Av. Chone.

Por lo tanto, el trabajo fue realizado en dos etapas, una de laboratorio que se llevó a cabo en las instalaciones del Campus Agropecuario, en el Laboratorio de Hongos Entomopatógeno y la de campo se realizó en la hacienda justo juez km 62 Av. Chone sector la sandía.

#### 3.2 Caracterización agroecológica de la zona

El Carmen, clasificado como clima monzónico amónico bajo el sistema de Köppen, se caracteriza por altas temperaturas y precipitaciones durante todo el año. Aunque las regiones ecuatoriales no son conocidas por cambios estacionales drásticos, el cercano Océano Pacífico expone el área a distintas variaciones climáticas: un invierno cálido y lluvioso de diciembre a mayo y un "verano" más templado y seco de junio a noviembre. Estos cambios están fuertemente influenciados por las corrientes de Humboldt y El Niño.

La ciudad cuenta con un clima isotérmico que se mantiene estable durante todo el año, gracias a sus abundantes y constantes niveles de precipitación de más de 2400 mm por año. El mes más cálido es abril, con una temperatura media de 23,7 °C, mientras que julio es el más frío con 22,3 °C. Con una humedad tan alta, la sensación térmica puede llegar a los 35°C, pero la temperatura media anual solo se sitúa en los 23°C. Marzo experimenta la mayor cantidad de lluvia con 21 días de aguacero en promedio, mientras que agosto ve la menor cantidad con solo 9 días de lluvia. A pesar de los niveles constantes de humedad, el promedio anual de la ciudad de 87,3 % de humedad relativa se mantiene constante.

**Tabla 3**

*Características agroecológicas de la localidad*

<b>Características</b>	<b>El Carmen</b>	<b>3.3</b>
Clima	Monzónico	
Temperatura (°C)	26,3 °C	
Humedad Relativa (%)	87.3%	
Heliofanía (Horas luz año <sup>-1</sup> )	1021.6	
Precipitación media anual (mm)	2420	
Altitud (msnm)	249	<b>3.4</b>

Fuente: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI, 2017)

### **Método estadístico**

Para la presente investigación se utilizó un diseño experimental no probabilístico con las siguientes variables:

### **Variables**

#### **3.5 Variables independientes**

- *Beauveria bassiana* como control biológico

### **3.6 Variable dependiente**

- Efectividad antiparasitaria (*in vitro* e *in situ*).
- Mortalidad de garrapatas (*in vitro* e *in situ*).
- Tiempo promedio de mortalidad de garrapatas (*in situ*).

### **3.7 Población de *Rhipicephalus microplus* para tratamiento**

Para la evaluación *in vitro* del efecto de *B. bassiana* sobre *R. (B.) microplus* se recolectaron garrapatas hembras adultas pletóricas (0,200-0,250 gr.) del ganado bovino extrayéndolas y se colocaron en platos petri, esto fue llevado a cabo en la ciudad del Cantón El Carmen-Manabí sector la sandía. Las garrapatas fueron depositadas en tubos de cristal con tapón de algodón para ser trasladadas al Centro de Investigación y Reproducción de Control Biológico, ubicado en el Campus agropecuario de la granja experimental (ULEAM), Ubicada en km 33Av. Chone.

### **3.8 Producción de conidias**

La cepa a evaluar, se encontraba conservada en sílica gel en el laboratorio de hongo entomopatógeno, tiene un tipo de crecimiento uniforme con producción de conidias sueltas y crece muy bien en extracto de Malta Agar y Papa Dextrosa Agar.

Para iniciar el proceso de producción, se pusieron gránulos de sílica gel conteniendo las conidias del hongo en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Los platos inoculados fueron colocados a temperaturas de 25 °C para su crecimiento (Incubación).

La observación del crecimiento de la cepa, se realizaron cada dos días para eliminar los platos contaminantes.

### **3.9 Elaboración de medio líquido**

Para la reproducción utilizamos la metodología de sustrato líquido de papa – dextrosa (PD), su elaboración consistió en lavar y pelar 300 g. de papas cortándose en trozos pequeños los cuales

se pusieron a hervir por 20 min. Para obtener la infusión, luego se filtró utilizando un embudo con algodón en la base, para no dejar pasar la papa después de enfriar se le agrego 10gr de dextrosa luego se mezcló bien el medio y se distribuyó en ocho Erlenmeyer, colocando 200 ml en cada uno, luego se sellaron y se pusieron a esterilizar en la auto clave a 121°C y 15 libras de presión por 15 minutos (Alves,1986).

### **3.10 Cultivo de la cepa de *Beauveria bassiana***

Se utilizó la cepa BbF2011 del hongo entomopatógeno *C. (B.) bassiana*. El hongo fue aislado y depositado en las instalaciones del Centro de Investigación y Reproducción de Control Biológico, ubicado en el Campus agropecuario de la granja experimental (ULEAM). El desarrollo y reproducción del hongo fue llevado a cabo en agar Saboraud dextrosa, con extracto de levadura (1%) y cloranfenicol a la concentración de 500 ppm. Luego se incubó a 25 °C y un 70% de humedad por tres semanas. La recolección de esporas se hizo por raspado, luego se detuvo en agua esterilizada con Tween 80 al 1 % que contenía este compuesto. La cantidad de conidias (1x10<sup>4</sup>, 1x10<sup>6</sup> y 1x10<sup>8</sup>) se estimó directamente en una cámara de Neubauer.

### **3.11 Elaboración de inoculación de las bolsas**

Se utilizó arroz 80% grano entero, luego se realizó el proceso de lavarlos, para así precocerlo sobre agua hirviendo por 15 minutos, posteriormente se dejó enfriar y se procedió al llenado de bolsas, colocando 200 g. en cada una de las bolsas de polipropileno; estas se sellaron y se esterilizaron a 121°C por 20 minutos. Las bolsas se sacaron de la autoclave y se dejaron enfriando hasta el día siguiente.

Para la inoculación de las bolsas se realizaron los siguientes pasos:

- Desinfestamos y encendimos la cámara de flujo laminar.
- Colocamos el mechero encendido sobre la cámara y los materiales a utilizar (equipo de

inoculación, las bolsas, el agua y el medio líquido conteniendo el hongo).

- Nos desinfectamos las manos con alcohol.
- Armamos el equipo, para inocular e introducimos la sonda dentro de la solución fungosa.
- Perforamos las bolsas sobre un círculo objetivo y depositamos 20 ml de solución fungosa en cada una de las bolsas bien distribuido.
- Sellamos y agitamos las bolsas.
- Extrajimos las bolsas de la cámara, se rotulan con la fecha y el número de la cepa del hongo utilizado.
- Colocamos las bolsas en el incubador.

### **3.12 Control de calidad de la producción**

Después de 5 a 10 días de inoculada las bolsas, se realizó el control de calidad del lote producido, que consistió en evaluar 3 parámetros:

#### **3.12.1 Conteo de Blastosporas**

El conteo de Blastosporas, se realizó tomando muestras del hongo de cada Erlenmeyer y se colocaron en el homocitómetro (cámara de Neubauer), utilizando los cuadros pequeños que tienen un factor de  $10^6$  se contaron 5 puntos de la cámara, los extremos y el centro para hacer un total de 25 cuadros pequeños y 4 repeticiones, para obtener la concentración de la suspensión.

La fórmula utilizada fue la siguiente:

- $X \cdot 25 \cdot 4 \cdot 10^6$  volumen de la dilución.
- **x**: promedio de conidias de las repeticiones.
- **25**: número de cuadrante contado.
- $4 \cdot 10^6$ : factor de los cuadrantes pequeños (Diámetro/Profundidad/Volumen)

### **3.12.2 Medición de la concentración de la suspensión fungosa**

De los platos que presentaron el mejor crecimiento de la cepa 114 se seleccionó dos platos, se realizó un raspado de las conidias con una espátula estéril y se colocó en tubos de ensayo con 5ml de agua estéril. Se extrajo un mililitro de la solución y se le añadió Tween 20 al 0,01%, luego se agitó para obtener una solución bacteriana uniforme, la cantidad de conidias se calculó utilizando los cuadros pequeños del homocitómetro y la fórmula propuesta, donde se logra conocer la concentración total de la suspensión.

- $n \cdot 4 \cdot 10^6$
- n: Número total de conidias observadas
- 4: Constante
- $10^6$ : Constante

### **3.12.3 Prueba de viabilidad**

La viabilidad se realizó, colocando en una caja petri con medio de cultivo (PDA) cuatro gotas de la suspensión del hongo y se evaluó la germinación a las 24 horas. Para evaluar la esporulación de los insectos que estaban expuestos al microorganismo, se instalaron en cámaras húmedas.

## **3.13 Montaje del Bioensayo en el laboratorio**

### **3.13.1 Descripción de tratamientos in vitro**

Una vez registrado el ingreso de garrapatas al laboratorio estas fueron desinfectadas con cloro (1%) y posteriormente pesadas para formar los grupos (Tabla 1). Se empleó la técnica de inmersión de adultas (Drummond y Whetstone, 1969) para evaluar los tratamientos; los tratamientos fueron: al grupo 1 se le aplicó una solución de  $1 \times 10^8$  conidias/ml de *B. bassiana* a partir de 1g en 9ml de agua destilada, al grupo 2 se le aplicó una dilución seriada en base 10 para

obtener  $1 \times 10^6$  conidias/ml, al grupo 3 fue un testigo de agua destilada. En todos los casos se utilizó la misma cantidad de líquido consistente en 1,5 ml del biopreparado.

Se utilizaron 75 garrapatas adultas y 75 ninfas por repetición para un total de 150 garrapatas en el bioensayo, obtenidas directamente del ganado vacuno, por extracción simple, las que se mantuvieron en el laboratorio durante la infección experimental.

### **3.13.2 Análisis estadístico**

El estudio se desarrolló mediante el método de estadística descriptiva en el que se detallan los resultados obtenidos de la presencia o ausencia de garrapatas posteriormente a la determinación de la solución con mayor efecto *in vitro*; la información y los datos obtenidos se analizaron mediante tablas y gráficos estadísticos que permitieron interpretar los resultados.

Muestra: La muestra estudiada en campo fue de 30 bovinos (terneros y adultos) que no mostraron síntomas de enfermedad infecciosa que comprometiera este ensayo o su integridad.

El tipo de muestreo utilizado en esta investigación fue por conveniencia no probabilística.

### **3.13.3 Prueba de patogenicidad**

Para la prueba de patogenicidad, se realizó bioensayo a técnica de inmersión de las garrapatas cada repetición, se evaluaron 75 garrapatas adultas y ninfas para un total de 2 repeticiones y 150 garrapatas evaluadas.

Las evaluaciones se realizaron cada 3 días hasta que murió la última garrapata, la mortalidad se midió en términos de porcentaje. La prueba de viabilidad se realizó colocando en un plato con medio de cultivo 4 gotas de la suspensión del hongo

### **3.13.4 Medición de la esporulación**

Las garrapatas muertas se montaron en cámara húmeda, utilizando platos petri plásticos y círculos de papel toalla que son colocado en plato petri, se agregó de 2 a 3 gotas de agua estéril.

Luego se colocaron las garrapatas muertas y se taparon, sellándolos y colocándolos en una incubadora que tenía una temperatura de 27°C y 80% de humedad relativa. La revisión se hizo 3 veces por semana.

### **3.13.5 Prueba de campo**

La evaluación en el campo se realizó en ganado bovino; terneros y adultos (toros y vacas).

Se seleccionaron de todos los animales, los más infectados de *Boophilus microplus*, para ser tratados con el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, obteniendo un total de 30, los cuales se separaron en 3 grupos de 10 animales cada uno.

Para obtener la muestra poblacional localizamos la parte de mayor población de *Boophilus microplus* presentes en el hospedero, (orejas, nuca, genitales, ubres, ingle). Se obtuvieron muestreos por la zona ecológica de la garrapata.

Con la imposibilidad de contar garrapatas debido a umbrales de población muy altos, se utilizó la técnica propuesta por Balladares en 1983, la cual indica que, al estar en presencia de una alta población, es imposible contabilizarla, lo cual conlleva a tomar muestreos visuales a través de los siguientes parámetros referenciales:

Infección leve: 30 % de la zona estudiada. Infección Media: 31% al 61% de la zona estudiada. Infección Alta: 61% al 100% de la zona estudiada.

#### **3.13.5.1 Obtención de los porcentajes de infección y recuentos**

Para calcular la tasa de infección y la garrapata, se dividió al vacuno en partes según la zona ecológica de esta (Balladares, 1983)

Se observó la parte más infectada, lo cual se realizó, con una cinta métrica, se mide el largo y ancho y se multiplicó la zona a evaluar, utilizando como parámetro contable los centímetros cuadrados, luego dicha zona se dividió en dos partes, para obtener diámetro de la zona estudiada,

y mediante de una regla de tres se sacan los porcentajes dividiendo entre el área total

### **3.13.5.2 Baños de los animales**

Se depositó, en un recipiente 2 bolsas de producto de *Beauveria bassiana* para lograr una concentración de conidias de  $1 \times 10^8$ , se agregó un galón de agua y se procedió a desprender las conidias del sustrato, para así llegar a obtener una mezcla homogénea del producto terminado, luego se vertió en una mochila de presión de 20 l, rellenando después con agua se iniciaron las aplicaciones por grupo y se llevó un registro por nombre de cada animal. Según el propietario dichas aplicaciones se llevaron a cabo a partir de las 5 de la tarde en adelante para favorecer la efectividad del hongo y se repitió una segunda aplicación la siguiente semana.

## **CAPÍTULO IV**

### **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El presente trabajo enmarcado a la efectividad de un control biológico para garrapatas en bovinos arrojo los siguientes resultados:

#### **4.1 Efectividad antiparasitaria, mortalidad y tiempo de acción *in vitro*.**

En la tabla 5 se describe el efecto de los diferentes tratamientos estudiados para el control de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en bovinos, donde se evidencio un efecto positivo para la concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/ml (tratamiento 1), mostrando una efectividad superior sobre los demás tratamientos, estos datos coinciden con lo expresado por Gómez & Jiménez (1996) quienes mencionan que la efectividad de productos comerciales de este tipo de bioinsumos expresan efectividad en los primeros días de su aplicación.

**Tabla 4**

*Efectividad in vitro de diferentes concentraciones de Beauveria bassiana sobre garrapatas.*

Tratamientos (soluciones)	Muestras por tratamiento (n)	Prueba de Patogenicidad (%)		
		< a 10 días	10 a 20 días	> 20 días
1×10 <sup>8</sup> conidias/ml	50	30%	85%	95% **
1×10 <sup>6</sup> conidias/ml	50	14%	60%	70%
Agua destilada (testigo)	50	-	-	-

\*\* Efectividad optima sobre parásitos.

Fuente. Elaborado por autor tras resultados de trabajo de campo

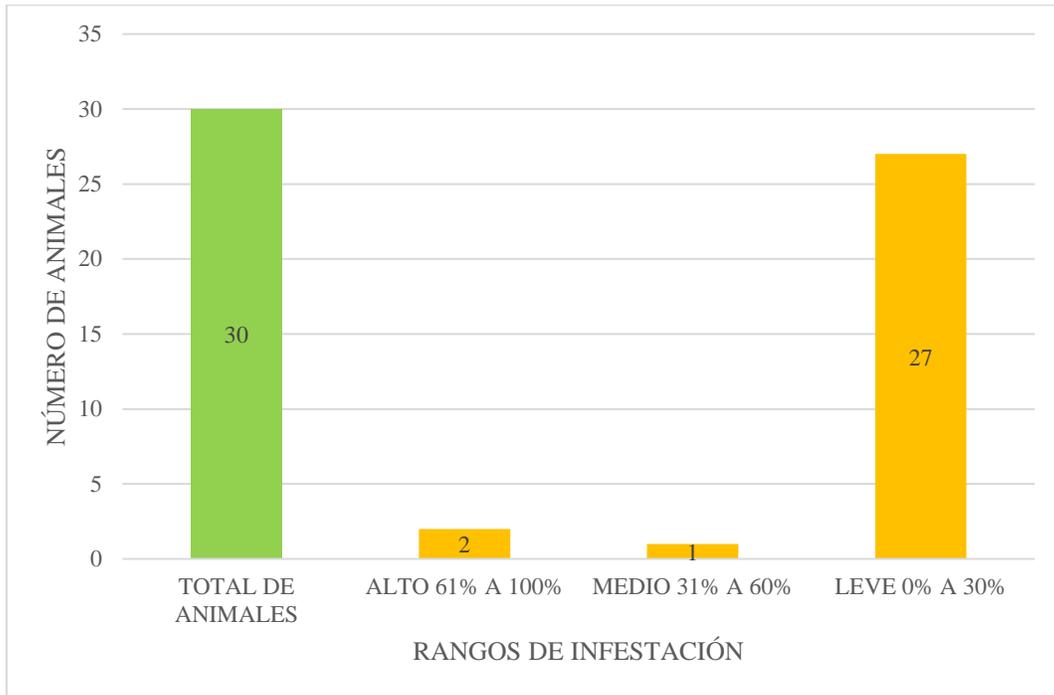
Se identificó el tiempo promedio de mortalidad para cada uno de los tratamientos, en donde las soluciones de ambos tratamientos mostraron eficacia en los primeros 10 días posterior a su aplicación en los diferentes grupos de parásitos respectivamente, sin embargo, el tratamiento 1 mostró mayor eficacia a partir del día 15 en adelante (85 % de mortalidad), similares datos expresan Chiriboga, Gómez, & Garcés (2015), con soluciones de 1×10<sup>8</sup> conidias/ml.

#### **4.2 Determinación del grado de infestación de los animales**

Se utilizaron un total de 30 animales, distribuidos uniformemente por cada grupo de estudio (según el grado de infestación parasitaria) y mediante el procedimiento descrito en la metodología (figura 3).

#### **Figura 3**

*Determinación del grado de infestación parasitaria.*



Fuente. Elaborado por autor tras resultados de trabajo de campo

Las zonas ecológicas donde se encontraron mayor presencia de garrapatas fueron las orejas, ubres, cola, glándula mamaria, testículos, ingle y perineo.

**4.3 Efectividad antiparasitaria, mortalidad y tiempo de acción *in situ*.**

La efectividad en campo se la realizó con la concentración de conidias que se manifestó de mejor forma en los bioensayos *in vitro*. En la Tabla 6. Se puede observar el comportamiento del bioensayo utilizado como método de control de garrapatas en bovinos.

**Tabla 5**

*Efectividad in situ de Beauveria bassiana sobre el control de garrapatas en bovinos.*

Grado de infestación	Número total	# Animales / Niveles de infestación post tratamiento
----------------------	--------------	--

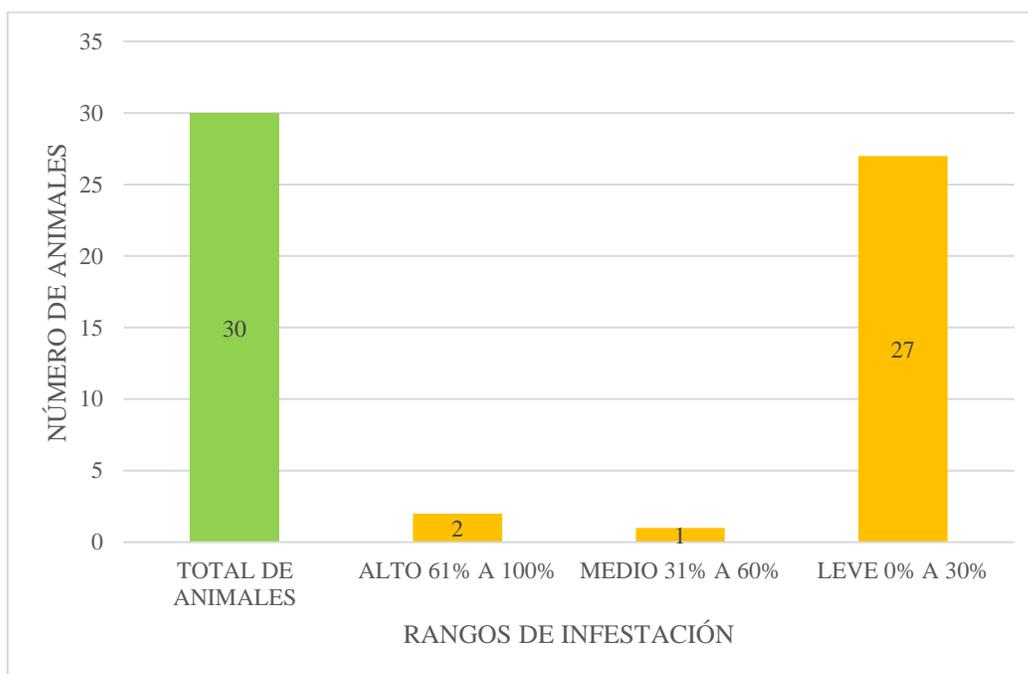
	de animales	Antes de la aplicación	Después de la aplicación*	Después de segunda aplicación**
Alto		15	8	2
Medio	30	5	2	1
Bajo		10	20	27

\*Respuesta a los 8 días post aplicación. \*\* Respuesta a los 16 días post aplicación.

Fuente. Elaborado por autor tras resultados de trabajo de campo

#### Figura 4

Porcentaje de infestación post aplicación 1.

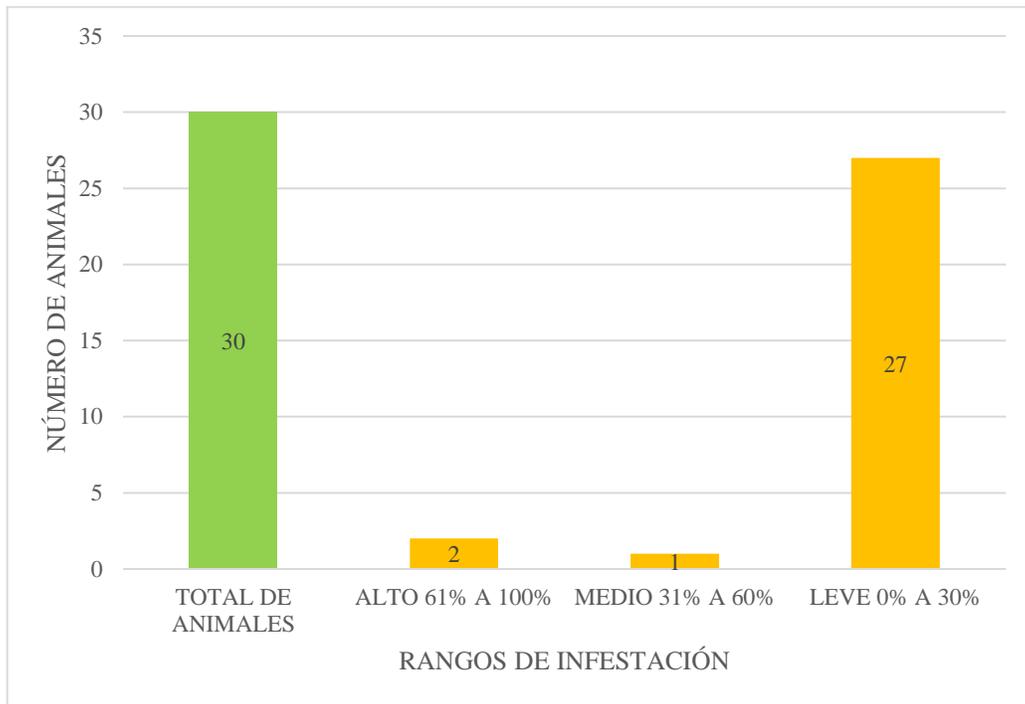


Fuente. Elaborado por autor tras resultados de trabajo de campo

Se puede evidenciar que a los ocho días posterior a la primera aplicación los animales con infestaciones altas se redujeron hasta un 53% y después de la segunda aplicación se obtuvo una efectividad representativa, expresando solo el 10% de animales con infestaciones altas y media; logrando una reducción de la infestación hasta un 90% (27 animales) del total de bovinos utilizados para este experimento.

**Figura 5**

Porcentaje de infestación post aplicación 2.



Fuente. Elaborado por autor tras resultados de trabajo de campo

#### 4.4 Discusión

La eficacia de la mortalidad del tratamiento fue evidente a los 10 días de su aplicación a varios grupos de parásitos. Aunque el tratamiento 1 requirió 15 días para hacer efecto, esto se alinea con los hallazgos de (Agudelo, et al., 2021; Del Pozo et al., 2018; Voltzit, 2007), quienes afirman que, si bien las garrapatas pueden ser susceptibles a hongos entomopatógenos, los niveles de virulencia varían significativamente entre cepas.

Según la investigación de Wang y Lege (2007), tanto la cepa del hongo *B. bassiana* lograron tasas de mortalidad superiores al 86%. Su estudio se centró en el control de hembras adultas de la especie *R. microplus* y reportó una eficiencia del 87 %. Además, este efecto de

control también se ha observado en otras especies de garrapatas como *A. nitens* (Soracá et al., 2021; Wang & Leger, 2007; Vinturelle et al., 2017)

Otros investigadores que emplearon el hongo *B. bassiana*, presentaron resultados que validan el proceso llevado a cabo en esta investigación, debido a que, en los tres tratamientos realizados se encontraron diferentes resultados de efectividad siendo el último un mayor porcentaje de mortalidad (Pérez & Rodríguez, 2019; Rodríguez et al., 2020). También se encuentra el estudio de (Fernández et al., 2010) donde realizaron un experimento en el que infectaron cepas de garrapata *R. microplus*, tanto sensibles como resistentes a organofosforados, con suspensiones de *M. anisopliae* que contenían de 10<sup>2</sup> a 10<sup>8</sup> conidias/ml. La mortalidad se midió a los 10, 15 y 20 días, y el hongo demostró una alta infectividad para ambas cepas de garrapatas, siendo las dosis de 10<sup>7</sup> y 10<sup>8</sup> las más letales.

Por otro lado, (Delgado & Murcia, 2011) en su estudio, la mezcla de cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* produjo una mayor tasa de mortalidad a dosis más bajas que el control, a pesar de una diferencia significativa en ambos casos por lo que se podría considerar aquello para futuras investigaciones que busquen un control biológico con resultados más rápidos. La literatura ha documentado los efectos sinérgicos y antagónicos de las mezclas de hongos entomopatógenos, con pruebas in vivo que sugieren que la producción de metabolitos durante el proceso infeccioso podría afectar el desempeño de cada cepa de hongo y reflejar una competencia en tasas más bajas de mortalidad de plagas.

La eficacia del hongo *B. bassiana* se puede atribuir a su capacidad para actuar como patógeno de garrapatas a través de varios métodos, que incluyen alta virulencia, adherencia, germinación y penetración en la cutícula y el tracto digestivo del huésped a través de mecanismos físicos y enzimáticos (Broglia et al., 2012). Además, los estudios han demostrado que los hongos

entomopatógenos son capaces de infectar a las garrapatas, desarrollarse en la hemolinfa (Benavides et al., 2016) y transmitirse de una garrapata a otra (Chiriboga et al., 2015).

Se necesita más investigación para validar la eficacia del enfoque anterior en escenarios del mundo real y determinar su posible integración en una estrategia de manejo integrado de plagas para el control de garrapatas. Este método podría servir como contramedida al creciente problema de la resistencia de las garrapatas a los agentes químicos y requerir la implementación de múltiples técnicas de control.

## CAPITULO V

### 5 CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados en el proyecto de investigación, se exponen las conclusiones.

- La *Beauveria bassiana* tiene un efecto directo para el control de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en bovinos.
- Las soluciones que mejor expresó la característica patogénica fue la concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/ml, *in vitro*.
- La mortalidad de garrapatas en el laboratorio fue hasta del 95% dentro de los primeros 20 días.
- El efecto en campo se evidencio desde la primera semana con un 53% de efectividad; sin embargo, una segunda dosis favorece de manera significativa a la reducción del grado de infestaciones altas en los bovinos hasta un 90%.

## CAPITULO VI.

### 6 RECOMENDACIONES

En base a la naturaleza de la investigación plantean las recomendaciones.

- Realizar nuevos estudios sobre la utilización de control biológico en infestaciones parasitarias de diferentes géneros de garrapatas.
- Es importante que se establezca un correcto protocolo para el cultivo y replicación del microorganismo, para poder establecer las concentraciones adecuadas para el control del parásito en sus diferentes estadios de desarrollo.
- Realizar investigaciones sobre el efecto de control de garrapatas en potreros.
- Socializar los resultados en los contenidos de las asignaturas a fines y en los proyectos de vinculación con la sociedad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdigoudarzi, M., Esmailnia, K., & Shariat, N. (2009). Laboratory study on biological control of ticks (Acari:ixodidae) by entomopathogenic indigenous fungi (*Beauveria bassiana*). *Iran J Arthropod Borne*, 3(2), 36-43.
- AGROCALIDAD. (2016). *Plaguicidas Prohibidos en el Ecuador*. AGROCALIDAD: <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/Plaguicidas-prohibidos-en-Ecuador-1.pdf>
- Agudelo, D., Kelly, B., & Bolivar, J. (2021). *Revisión sobre los hongos Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae y Trichoderma spp como biocontrol de la garrapata Rhipicephalus microplus*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Alazogaray, R., Luz, C., Ionizete, G., Silva, I., Lecuona, R., & Tigano, M. (1998). Effect of Deltamethrin on Germination and Virulence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill on *Triatoma infestans* (Klug). *Un. Soc. Entomol. Brasil*, 27(4), 663-667.
- Álvarez, V., Matamoros, T., & Mena, A. (2017). Determinación, in vitro, de la eficacia de los hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, en el control de la garrapata común del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Ciencias Veterinarias*, 35(1), 43-57.
- Avellaneda, D., Barrera, A., & Calderón, L. (2020). *Analizar mediante una revisión sistemática las alternativas de control integrado de origen biológico, frente a la resistencia a acaricidas, de garrapatas de la familia Ixodidae (Rhipicephalus Sanguineus y Rhipicephalus (Boophilus) Microplus)*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca .
- Ávila, R., Mancilla, G., González, P., Sandoval, C., & Torres, F. (2019). Bioensayos in vitro de

- relevancia en las ciencias biológicas y agropecuarias. *Bioagrociencias*, 34-41.
- Bautista, A., González, N., & Gómez, A. (2021). Patogenicidad in vitro de cepas de *Metarhizium anisopliae* en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Iberoamericana De Bioeconomía Y Cambio Climático*, 7(13), 1544-1557.
- Benavides, E., Romero, J., & Luis, V. (2016). *Guía para el manejo de garrapatas y adaptación al cambio climático*. IICA.
- Bravo, K., & Carranza, A. (2022). *Uso De Hongos Entomopatógenos Como Alternativa En El Control Biológico De Garrapatas En La Provincia De Santo Domingo De Los Tsáchilas*. INIAP-Estación Experimental Santo Domingo.
- Broglio, S., de Souza, S., Valente, L., Araújo, E., da Silva, M., & Gómez, M. (2012). Evaluación de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887)(Acari: Ixodidae). *Idesia (Arica)*, 30(1), 93-99.
- Bustillo, A. (2001). *Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia*. In: *seminario Uso de entomopatógenos en Colombia*. Sociedad Colombiana de Entomología.
- Castro-Silva, W., De-Souza, J., Meneses, D., Heinzen, H., & Cesio, M. (2009). Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol*, 64, 267-274.
- Castro, P., Vera, T., Indacochea, G., & Valverde, L. (2018). Control etológico de *Thrips* sp. (Insecta: Thysanoptera) y *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of the Selva Andina Research Society*, 9(2), 104-112.
- Cazorla, D., & Morales, P. (2010). Compatibilidad de 13 aislamientos de *Beauveria bassiana* patógenos para *Rhodnius prolixus* (Triatominae) con insecticidas químicos. *Boletín de*

- Malariología y Salud Ambiental*, 50(2), 261-270.
- Chiriboga, H., Gómez, G., & Garcés, K. (2015). *BEAUVERIA BASSIANA, HONGO ENTOMOPATÓGENO PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE HORMIGAS CORTADORAS* (Vol. I). (2. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), Ed.) Asunción, Paraguay. [https://doi.org/ISBN: 978-92-9248-592-4](https://doi.org/ISBN:978-92-9248-592-4)
- Correa, F. (2006). *Manual de Laboratorio de bioensayos. Universidad Autónoma de Baja California*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA .
- Cortinas, R., & Jones, C. (2006). Ectoparasites of cattle and small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 22, 673-693.
- De Faria, M., & Wraight, S. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43, 237–256.
- Del Pozo , E., García, I., & Herrera, Y. (2018). Efectividad de aislados de *Beauveria bassiana* “sensu lato” sobre *Rhipicephalus microplus*. *Centro Agrícola*, 45(3), 5-10.
- Delgado, P., & Murcia, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambi-Agua*, 6(2), 77-90.
- EDIFARM. (2017). *Vademecum Veterinario XV*. <https://www.edifarm.com.ec/vademecum-veterinario-2017/>.
- Estrada, A., Bouattour, J., Camicas, A., Guglielmone, H., Jongejan, A., Latif, R., & Walker, A. (2006). The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Exp Appl Acarol*, 38, 219–235.
- Fan, Y., Fang, S., Guo, X., Zhang, Y., Xiao, D., Jin, K., & Bidochka, Y. (2007). Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied*

- and Environmental Microbiology*, 73, 295–302.
- FAO. (2016). *Animal Production And Health. Ticks and tick-borne diseases*. FAO: <http://www.fao.org/DOCREP/004/X6538E/X6538E00.HTM>
- FAO. (2017). *Directrices para reforzar los servicios de sanidad animal en los países en desarrollo*. Roma: FAO. *Serie de Informes Técnicos*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Fernández, M., Berlanga, A., Cruz, C., & Hernández, V. (2010). Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la inhibición de oviposición, eclosión y potencial reproductivo en una cepa triple resistente de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). *Entomotropica*, 25(3), 109-115.
- Fuguet, R., Théraud, M., & Vey, A. (2004). Production in vitro of toxic macromolecules by strains of *Beauveria bassiana*, and purification of a chitosanase-like protein secreted by a melanizing isolate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 138, 149–161.
- Furman, D., & Loomis, E. (1984). *The Ticks of California*. Bulletin of the California Insect Survey.
- Galindo, A., Pulido, M., & García, D. (2016). Effect of *Beauveria bassiana* (Ascomycota) on control of *Rhipicephalus microplus* (Arachnida: Ixodida, Ixodidae) resistant to ixodicides. *Revista Científica, FVC-LUZ*(5), 331 - 336.
- García, D. (2013). *Evaluación in vitro del efecto de Cordyceps (Beauveria) bassiana en el control biológico de la fase adulta de Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA.
- Gillespie, A., & Claydon, N. (1989). The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Science*, 27, 203–215.

- Gómez, M., & Jiménez, C. (1996). *Evaluación de la patogenicidad de 10 cepas de Beauveria bassiana y 10 cepas de Metarrizium anisopliae sobre el picudo de algodón* (Vol. I). León, Nicaragua: UNAN.
- Graf, J., Gogolewsk, N., Leach, G., Sabatini, M., Molento, E., & Arantes, G. (2004). Tick control: an industry point of view. *Parasitol.* 129, 427–442.
- Guglielmone, A., Estrada, A., Keirans, J., & Robbins, R. (2003). *Ticks (Acari: Ixodidae) of the Neotropical Zoogeographic Region*. The Netherlands: International Consortium on Ticks and Tick – borne Diseases.
- Guglielmone, H., Szabó, M., Martins, J., & Estrada, A. (Editorial Butantan). *Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies*. São Paulo. 2006.
- Guillén, N., & Muñoz, L. (2013). *Estudio taxonómico a nivel de género de garrapatas en ganado bovino de la parroquia Alluriquín - Santo Domingo de los Tsáchilas*. ESPE.
- Herrera, L., & Romero, A. (2022). *Control de ninfas de garrapatas (Rhipicephalus microplus) en combinación de Beauveria spp. con moléculas orgánicas y químicas*. ESPE.
- INAMHI. (2017). *ANUARIO METEOROLÓGICO*. Ecuador: [http://www.serviciometeorologico.gob.ec/docum\\_institucion/anuarios/meteorologicos/Am\\_2013.pdf](http://www.serviciometeorologico.gob.ec/docum_institucion/anuarios/meteorologicos/Am_2013.pdf).
- Kaaya, G., & Hedimbi, M. (2012). The use of entomopathogenic fungi, Beauveria bassiana and Metarrhizium anisopliae, as bio-pesticides for tick control. *Int J Agric Sci*, 2(6), 245-250.
- MAG. (2020). *Manual técnico de procedimientos para el registro y control de agentes de control biológico, extractos vegetales, preparados minerales, semioquímicos y productos afines*

*de uso agrícola*. MAG.

- Ming, S., Qiaoyun, R., Guiquan, G., Yufeng, L., Xueqing, H., Chao, M., Hong, Y., & Jianxun, L. (2013). Effectiveness of *Beauveria bassiana* sensu lato strains for 45 biological control against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in China. *Parasitol*, *62*, 412-415.
- Molano, C., Monroy, E., & Suárez, N. (2022). Evaluación del efecto ixodicida de extractos botánicos sobre garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ciencia en Desarrollo*, *13*(2), 1-9.
- Mollier, P., Lagnel, J., Fournet, B., Aïoun, A., & Riba, G. (1994). A glycoprotein highly toxic for *Galleria mellonella* larvae secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria sulfurescens*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *64*, 200–207.
- Moya, D., Perdomo, S., Tofiño, A., & Ortega, M. (2018). Efectividad de *Beauveria bassiana* (Baubassil®) sobre la garrapata común del ganado bovino *Rhipicephalus microplus* en el Departamento de la Guajira, Colombia. *Revista Argentina de microbiología*, *50*(4), 426-430.
- Nava, S., Morel, N., Rossner, M., Toffaletti, J., Sarmiento, N., & Mangold, A. (2021). *Bases epidemiológicas para el control estratégico de la garrapata común del bovino Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. estación Experimental Agropecuaria Rafaela, INTA.
- Nunes, P., Barrios, R., Silva, R., & Romero, G. (2019). EVALUACIÓN IN VITRO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN EL CONTROL DE LA GARRAPATA DEL GANADO BOVINO. *Saber*, *31*, 283-293.
- Onofrio, V., Labruna, M., Pinter, A., Giacomin, F., & Barros, D. (2006). Comentários e chaves para as espécies do gênero *Amblyomma*. *Scientiae*, *21*(1), 14-19.

- Oporta, J. (2017). *Control microbiano de la garrapata Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) del ganado bovino, con hongos entomopatógenos en condiciones de laboratorio*. Universidad Nacional Agraria.
- Pacheco, M., Reséndiz, J., & Arriola, V. (2019). Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: una revisión. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 10(56), 4-32.
- Paião, J., Monteiro, A., & Kronka, S. (2001). Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. *World J Microb Biot*, 17, 245-251.
- Parola, P., & Raoult, D. (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans. An emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 897-928.
- Patarroyo, J., Vargas, M., Gonzales, C., Guzmán, F., Martins, O., Afonso, L., Valente, F., Peconick, A., Marciano, A., Patarroyo, V., & Sossai, S. (2009). Immune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm7462® against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol*, 166, 333–339.
- Pedrini, N., Crespo, M., & Juárez, P. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146, 24–137.
- Pérez, O., & Rodríguez, L. (2019). *Distribución de la resistencia a los acaricidas amitraz, ivermectina y alfacipermetrina en garrapatas Boophilus microplus y posibles factores de riesgo asociados, en la zona ±0.5 grados de latitud de la línea equinoccial de Ecuador*. UCE.
- Polanco, D., & Ríos, L. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*, 17, 81-95.

- Pucheta, M., Flores, A., Rodríguez, S., & de la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31, 856–860.
- Pulido, A., Castañeda, R., Ibarra, H., Gómez, L., & Barbosa, A. (2016). Microscopía y Principales Características Morfológicas de Algunos Ectoparásitos de Interés Veterinario. *RIVEP*, 98.
- Rebaza, N., Zavaleta, G., Blas, W., Saldaña, J., & Huaman, J. (2020). ACTIVIDAD LARVICIDA DE *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis Y *Beauveria bassiana* SOBRE *Aedes aegypti* LARVICIDAL ACTIVITY OF *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis AND *Beauveria bassiana* ON *Aedes aegypti*. *REBIOL*, 40(1), 53-68.
- Rodríguez, C., Ulloa, S., & Niño, L. (2020). Background on the control of the cattle tick *R. (B.) microplus* and the use of coumarin substances as an alternative. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, 8(4), 215-232.
- Rodríguez, R., Hodgkinson, J., & Trees, A. (2012). Acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Current status and mechanisms of resistance. *Rev Mex Cienc Pecu*, 3(1), 9-24.
- Rodriguez, R., Jonsson, N., & Bhushan, C. (2018). Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitol Res*, 117, 3-29.
- Salari, S., Vatandoost, H., Telmadarraiy, Z., Entezar, R., & Kia, E. (2008). Seasonal Activity of Ticks and their Importance in Tick-Borne Infectious Diseases in West Azerbaijan, Iran. *Iranian J ArthropodBorne Dis*, 2, 28-34.
- Servicios Ganaderos. (2 de Agosto de 2016). *Twitter*.  
<https://twitter.com/Servegan/status/760654528152760320/photo/1>
- Shyma, K., Gupta, J., Singh, V., & Patel, K. (2015). *n vitro* detection of acaricidal resistance status

- of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* against commercial preparation of deltamethrin, flumethrin, and fipronil from North Gujarat. *India. J Parasitol Res.*
- Soracá, A., Valbuena, A., & Boyacá, Y. (2021). Efecto del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (balsamo) Vuillemin en el control de la oveja ked (*Melophagus ovinus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(2).
- St. Leger, R., Joshi, L., Bidochka, M., & Roberts, D. (1996). Construction of an improved mycoinsecticide over expressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 93, 6349–6354.
- Tanada, Y., & Kaya, H. (1993). *Insect pathology*. Academic Press.
- Téllez, A., Cruz, M., Flores, Y., Torres, A., & Arana, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología*, 30.
- Tipás, J. (2020). *Evaluación del efecto acaricida de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae en el control de la garrapata Rhipicephalus microplus*. ESPE.
- Vargas, M., Céspedes, N., Sánchez, H., Martins, J., & Céspedes, C. (2003). Avaliação in vitro de uma cepa de campo de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistente à amitraz. *Cienc Rural*, 33, 737–742.
- Vinturelle, R., Mattos, C., Meloni, J., Nogueira, J., Nunes, M., Vaz, I., Rocha, L., Lione, V., Castro, H., & Das Chagas, E. (2017). In Vitro Evaluation of Essential Oils Derived from *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Citrus limonum* (Rutaceae) against the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Biochem Res Int* (5342947).
- Voltzit, O. (2007). A review of Neotropical *Amblyomma* species (Acari: Ixodidae). *Zoological Museum of Moscow State University*, 15(1), 3-134.
- Wang, C., & Leger, S. (2007). The MAD1 adhesion of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with

blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachments to plants. *Eukaryotic*, 808–816.

Wei-Zhen, L., Boucias, D., & McCoy, C. (1995). Extraction and characterization of the insecticidal toxin Hirsutellin A produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii*. *Experimental Mycology*, 19, 254–262.

Yao, J., & Huang, D. (2004). The study on the correlation between protease, chitinase and  $\beta$ -N-GlcNAcase production and the virulence of *Beauveria bassiana* to *Dendrolimus punctatus* (in Chinese). *J Suzhu Col 2*, 19(4), 102-106.

## ANEXOS

### Anexo 1

*Visitas de campo realizadas*



*aplicacion de Beauveria bassiana*

## Anexo 2

*Registro de infección en bovinos*



## Anexo 3

*Análisis en laboratorio*

