

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA TIERRA
ESCUELA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
AGROPECUARIO

“Eficacia de *Metarhizium* spp. en el control de garrapatas adultas en condiciones *in vitro*”

AUTOR:

Luis Humberto Masapanta Cuchiparte

DIRECTOR DE PROYECTO:

Dr. Segundo Benedicto Valle Ramírez, Ph.D.

Dr. Willian Orlando Caicedo Quinche, Ph.D.

PUYO – PASTAZA – ECUADOR

2019

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS.

Yo, Luis Humberto Masapanta Cuchiparte, bajo juramento declaro que el trabajo aquí descrito es mi total autoría que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se concluyen en el presente documento.

A través de la presente declaración cedo los derechos de la propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la Universidad Estatal Amazónica de Pastaza, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y Normatividad Institucional vigente.

.....
Luis Humberto Masapanta Cuchiparte.

C.I.: 120549377-6

Autor.

INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título: “Eficacia de *Metarhizium* spp. en el control de garrapatas adultas en condiciones *in vitro*”

Autor: Luis Humberto Masapanta Cuchiparte.

Unidad de titulación: Ingeniería Agropecuaria.

Director del Proyecto: Dr. Segundo Benedicto Valle Ramírez, Ph.D.

Fecha: 4 de enero del 2019

Introducción y contexto de la investigación:

La introducción expresa de manera clara, la importancia y el propósito del proyecto la investigación se enmarca dentro del contexto amazónico para dar respuesta a la necesidad del uso de hongos entomopatógenos en el control de garrapatas.

Cumplimiento de los objetivos:

La investigación cumple con los objetivos planteados, mismos que nos permiten obtener la mortalidad de garrapatas (teologinas) del ganado bovino mediante la utilización de hongos entomopatógenos en condiciones de laboratorio.

Principales resultados obtenidos.

El estudiante **Luis Humberto Masapanta Cuchiparte**, ha mostrado durante el desarrollo de la investigación una eminente dedicación, y un alto grado de independencia, sirviendo como guía de los principales elementos a desarrollar en la investigación.

Se destacó la actividad curricular por su rendimiento académico, mostrado durante la investigación interés, motivación en el mismo, lo cual condujo a culminar de forma exitosa el trabajo, cumpliendo las 400 horas establecidas en el Reglamento de Régimen Académico de la UEA.

La presentación final del trabajo cumple con las normas establecidas en la reglamentación institucional.

La redacción, ortografía, calidad de los gráficos, cuadros y anexos es adecuada.

Sin otro particular.

Atentamente,

Dr. Segundo Benedicto Valle Ramírez, Ph.D.

1600538894

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Por medio del presente, Yo, Segundo Benedicto Valle Ramírez, con número de cedula 1600538894, certifico que el egresado Luis Humberto Masapanta Cuchiparte, realizó su Proyecto de investigación y Desarrollo Titulado “Eficacia de *Metarhizium* spp. en el control de garrapatas adultas en condiciones *in vitro*” previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario bajo mi supervisión.

.....

Ing. Segundo Benedicto Valle Ramírez, Ph.D.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.



UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA
SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND



Oficio No. 121-IL-UEA-2018

Puyo, 07 de enero de 2019

Por medio del presente **CERTIFICO** que:

El trabajo de titulación correspondiente al estudiante. MASAPANTA CUCHIPARTE LUIS HUMBERTO C.I. 1205493776, con el Tema: "**Eficacia de *Metarhizium spp.* En el control de garrapatas adultas en condiciones *in vitro***", de la carrera Ingeniería Agropecuaria, Director de proyecto Dr. Segundo Valle Ramírez, PhD, ha sido revisado mediante el sistema antiplagio URKUND, reportando una similitud del 6%, Informe generado con fecha 7 de enero de 2019 por parte del director, conforme archivo adjunto.

Particular que comunico a usted para los fines pertinentes

Atentamente,

Ing. Italo Marcelo Lara Pilco MSc.

ADMINISTRADOR DEL SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND – UEA - .

Urkund Analysis Result

Analysed Document: PROYECTO MASAPANTA 2019.docx (D46514435)
Submitted: 1/7/2019 11:02:00 PM
Submitted By: wcaicedo@uea.edu.ec
Significance: 6 %

Sources included in the report:

ANTEPROYECTO-CORREGIDO-VIVI.docx (D36894347)
https://www.researchgate.net/publication/304119207_Estrategias_para_el_control_de_la_garrapata_Boophilus_microplus_y_la_mitigacion_de_la_resistencia
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-65762015000200004
<http://www.ciba.org.mx/index.php/CIBA/article/view/68/325>
<https://www.sabermas.umich.mx/formato-pdf.html?download=66:numero-34>

Instances where selected sources appear:

11

**CERTIFICADO DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE
SUSTENTACIÓN**

.....

Dr. Karina Carrera, Ph.D.

PRESIDENTA

.....

Dr. Francisco Lam, Ph.D.

MIEMBRO

.....

Ing. Sandra Soria Re, Ms.C.

MIEMBRO

AVAL

Doctor

Segundo Benedicto Valle Ramírez, Ph.D.

Docente de la Universidad estatal Amazónica avaliza el Proyecto de investigación.

Título: “Eficacia de *Metarhizium* spp. en el control de garrapatas adultas en condiciones *in vitro*”.

Autor: Luis Humberto Masapanta Cuchiparte.

Certifico haber acompañado el proceso de elaboración del Proyecto de investigación y considero cumple los lineamientos y orientaciones establecidas en la norma vigente de la institución.

Por lo antes expuesto se avala el proyecto de investigación para que sea presentado ante la coordinación de la carrera Ingeniería Agropecuaria como forma de la titulación como Ingeniería en Agropecuaria y que dicha instancia considere el mismo a fin de que tramite lo que corresponda.

Para que si conste, firmo la presente a los 04 días del mes de enero de 2019.

Atentamente,

Dr. Segundo Benedicto Valle Ramírez, Ph.D.
1600538894

AGRADECIMIENTO

Ante todo agradezco a Dios por la vida, la bondad y el amor sembrado en mí, así permitiéndome alcanzar mis metas propuestas las cuales estuvieron llenas de experiencias y momentos muy agradables. A mi madre por su gran amor, apoyo incondicional y por confiar hasta cuando yo dudaba de mí, a mis docentes por la inmensa paciencia, sus conocimientos y enseñanzas compartidas en clases de la cual me llevo todo lo aprendido a la Universidad, la cual me recibió con sus puertas abiertas permitiéndome entrar en ella y adquirir los conocimientos brindados en ella; que como una planta días tras días se riega hasta convertirse en una árbol el cual hoy brinda frutos para la sociedad.

DEDICATORIA

Para la mujer que más amo la que siempre estuvo orgullosa de mí, llegando a amarme desde antes de nacer y por ayudarme a levantar de cada tropiezo es para ti mí amada madre. A mi familia por brindarme su apoyo incondicional en todo momento aunque la distancia nos separe, siempre estuvieron cerca alentándome a cumplir mis metas planteadas.

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la eficacia de hongos entomopatógenos, como agentes de control microbiano de la garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus microplus*, se realizó un estudio para evaluar el efecto sobre la mortalidad en teleoginas de *R. microplus*, bajo condiciones de laboratorio. El hongo entomopatógeno evaluado fue *Metarhizium* spp. Para la evaluación de los tratamientos, se estableció un diseño completamente al azar con 8 tratamientos y 3 repeticiones. Los tratamientos evaluados consistieron en cinco concentraciones de conidios/ml 1×10^6 ; $0,5 \times 10^7$; 1×10^7 ; $0,5 \times 10^8$ y 1×10^8 conidios.mL⁻¹, dos tratamientos químicos (Amitraz® en dosis de 1mL.L⁻¹ de agua y Garrakill® en dosis de 1mL.L⁻¹ de agua) y un tratamiento control (con agua destilada estéril+Tween 80® al 0,1%). Cada unidad experimental estaba conformada por diez teleoginas. Las teleoginas se obtuvieron del ganado bovino infestado naturalmente. El muestreo se realizó cada 24 horas después de realizada la inoculación, registrando el número de teleoginas vivas y muertas. Para comparar los tratamientos en cuanto a mortalidad acumulada y corregida se realizó un análisis de varianza de clasificación simple y prueba de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0,05$). Para el análisis se empleó el programa INFOSTAT Versión 2018. Además con los datos de mortalidad del último día de evaluación se determinó la concentración letal media (CL50) y concentración letal noventa (CL90) del aislamiento nativo de *Metarhizium* ssp. TI6301 mediante el análisis Probit, con el uso del programa SPSS Versión 22. En conclusión los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio demostraron que la concentración 1×10^8 conidios.mL⁻¹ del aislamiento nativo TI6301 de *Metarhizium* spp. constituye una alternativa ecológica para el control de garrapatas (teleoginas) de *R. microplus*.

ABSTRACT

In order to evaluate the efficacy of entomopathogenic fungi, as microbial control agents of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*, a study was conducted to evaluate the effect on mortality in teleoginas of *R. microplus*, under laboratory conditions. The entomopathogenic fungi evaluated was *Metarhizium anisopliae*. For the evaluation of the treatments, a completely random design was established with 8 treatments and 3 repetitions. The treatments evaluated consisted of five concentrations of conidia / ml 1×10^6 ; $0,5 \times 10^7$; 1×10^7 ; $0,5 \times 10^8$ y and 1×10^8 conidios.mL⁻¹, two chemical treatments (Amitraz® in doses of 1mL.L-1 of water and Garrakill® in doses of 1mL.L-1 of water) and a control treatment (with distilled water sterile + 0.1% Tween 80®). Each experimental unit consisted of ten teleoginas. The teleogins were obtained from naturally infested cattle. Sampling was done every 24 hours after the inoculation, recording the number of living and dead teleoginas. To compare the treatments in terms of cumulative and corrected mortality, a variance analysis of simple classification and Tukey multiple range test ($p \leq 0,05$) was performed. For the analysis, the INFOSTAT program, Version 2018, was used. In addition, with the mortality data from the last day of evaluation, the mean lethal concentration (LC50) and lethal concentration ninety (CL90) of the native isolation of *Metarhizium* ssp. TI6301 through the Probit analysis, with the use of the SPSS Version 22 program. In conclusion the results obtained under laboratory conditions showed that the concentration 1×10^8 conidios.mL⁻¹ of the native isolate TI6301 of *Metarhizium* spp. constitutes an ecological alternative for the control of ticks (teleoginas) of *R. microplus*.

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
1.3. OBJETIVOS.....	3
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
CAPITULO II.....	4
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	4
2.1. GENERALIDADES DE LAS GARRAPATAS Y SU INCIDENCIA EN LA GANADERÍA.....	4
2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	4
2.3. MORFOLOGÍA DE LAS GARRAPATAS.....	5
2.4. CICLO BIOLÓGICO Y ECOLOGÍA DE LAS GARRAPATAS.....	6
2.5. ESTRATEGIAS DE CONTROL DE GARRAPATAS.....	8
2.6. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS. ..	9
2.6.1. ADHESIÓN DE LA CONIDIA A LA CUTÍCULA DEL INSECTO.....	9
2.6.2. GERMINACIÓN DE LA CONIDIA.....	9
2.6.3. PENETRACIÓN DEL INTEGUMENTO.....	9
2.6.4. MULTIPLICACIÓN DEL HONGO EN EL HEMOCELE.....	10
2.6.5. PRODUCCIÓN DE TOXINAS.....	10
2.6.6. MUERTE DEL INSECTO.....	10
2.6.7. COLONIZACIÓN.....	10
2.6.8. EMERGENCIA.....	11
2.6.9. ESPORULACIÓN.....	11
2.6.10. DISEMINACIÓN.....	11

2.7. DESCRIPCIÓN DE LOS PRODUCTOS QUÍMICOS.....	11
2.7.1. FICHA TÉCNICA DEL GARRAKILL®.....	11
2.7.2. FICHA TÉCNICA DEL AMITRAZ®.	12
CAPÍTULO III	13
3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	13
3.1. LOCALIZACIÓN.....	13
3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN.	13
3.3. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	13
3.4. MÉTODOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	13
CAPÍTULO IV	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
4.1. EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DEL AISLAMIENTO NATIVO DE <i>METARHIZIUM</i> SPP. Y GARRAPATICIDAS QUÍMICOS EN EL CONTROL DE GARRAPATAS ADULTAS (TELEOGINAS).....	17
4.2. DOSIS LETAL MEDIA (DL ₅₀) Y DOSIS LETAL NOVENTA 90(DL ₉₀) DEL AISLAMIENTO NATIVO DE <i>METARHIZIUM</i> SPP.....	20
CAPITULO V.	21
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	21
CONCLUSIONES.....	21
RECOMENDACIONES	21
CAPITULO VI.....	22
6. BIBLIOGRAFÍA.....	22
CAPITULO VII.....	25
ANEXOS.....	25

CAPÍTULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus microplus* (anteriormente *Boophilus microplus*) Canestrini (Acari: Ixodidae) es un ectoparásito hematófago que se encuentra con frecuencia en bovinos, en regiones tropicales y subtropicales (Polanco y Ríos, 2016; Rodríguez y Pulido, 2015).

Las garrapatas afectan al 80% del ganado bovino mundial, con pérdidas en US\$ 7 billones y de esos un billón corresponde a Latinoamérica (Polanco y Ríos, 2016).

En Ecuador la garrapata *R. microplus* se encuentra distribuida en las cuatro regiones: Costa, Sierra, Oriente e Insular (Vasco, 2013). Por lo que en un estudio realizado por Espinoza (2017) en la provincia de Zamora Chinchipe, determinó que el 100% de las garrapatas encontradas pertenecen a la especie reportada a nivel nacional.

Este ectoparásito crea perjuicios en las producciones ganaderas bovinas por acción directa o por las enfermedades que estas pueden transmitir (Ojeda, Rodríguez, Galindo, Lezama y Cruz, 2011). Se destaca la transmisión de microorganismos de los cuales es vector, como *Babesia* spp., y *Anaplasma* spp.; así mismo, induce anemia, daño de la piel y estrés; esto último conduce a anorexia, disminución de peso, baja natalidad o preñez e incremento en los costos de producción por el uso de tratamientos para erradicar o controlar a este ectoparásito en los sistemas de producción animal (Polanco y Ríos, 2016; Rodríguez y Pulido, 2015).

El conocimiento de la biología de la garrapata *R. microplus* es esencial para saber cómo se transmiten la babesiosis y anaplasmosis bovina y esto permitirá establecer una estrategia de control apropiada y económica en las explotaciones ganaderas del país (Vázquez, 2010).

A pesar de que en el ámbito mundial se han utilizado diferentes estrategias para controlar estos ectoparásitos, a través, del manejo integrado con control inmunológico por medio de vacunas, hongos, etc., el método más empleado incluye el tratamiento con compuestos químicos como piretroides, organofosforados, carbamatos. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos fármacos ha favorecido suresidualidad en diferentes componentes del ecosistema y la selección de poblaciones de garrapatas resistentes, hasta hacer ineficaz su uso (Rodríguez y Pulido, 2015).

El uso exagerado de ixodicidas químicos, bajo un esquema de erradicación, genera resistencia a los ixodicidas, aumenta los costos requeridos para el control de las garrapatas, bien sea porque exige la asociación de productos o bien porque se deben utilizar dosis mayores. El método de control tradicional mediante el uso de acaricidas químicos, como es el caso de la ivermectina aunque ha sido exitoso, ha traído serios problemas de contaminación en la carne y la leche (Pérez *et al.*, 2006), así como la contaminación del ambiente, y el incremento de los costos de producción. Por tal motivo, deben evaluarse alternativas sostenibles de control que reduzcan la aplicación de químicos, que garanticen eficacia contra garrapatas en bovinos y que estén inmersas en el control integrado de parásitos, donde se combinan estrategias físicas, químicas y biológicas con efecto sinérgico (Pérez, 2015).

Entre las estrategias biológicas se destaca el uso de hongos entomopatógenos, dada su amplia distribución natural, bajo riesgo para la salud de humanos y animales, compatibilidad ambiental, alta virulencia sobre garrapatas y bajo costo. Entre los hongos entomopatógenos que han provocado alta mortalidad de *R. microplus* en ensayos de laboratorio se encuentran *Beauveria bassiana* (Balsamo) y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Ángel *et al.*, 2010; Camargo *et al.*, 2012).

En condiciones *in vitro* e *in vivo* *M. anisopliae* ha demostrado eficacias que van de 50-100% para el control de todas las fases de desarrollo de *R. microplus*, afectando su índice reproductivo, longevidad, eclosión, entre otros (Rodríguez, Rodríguez, Ojeda, Galindo y Cruz, 2014). Por ejemplo en un estudio realizado por Bautista, Pimentel y Gómez (2017), al evaluar la eficacia de una cepa nativa de *Metarhizium anisopliae* en el control de garrapatas en animales infestados verificaron una eficacia del 78,45% a los 15 días de la aplicación. Sin embargo, la eficacia de *M. anisopliae* puede variar dependiendo de la cepa, virulencia y condiciones de temperatura y humedad ambiental de cada zona (Rodríguez-Alcocer *et al.*, 2014).

1.2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

En las explotaciones ganaderas de las zonas tropicales y subtropicales de Ecuador existe una alta incidencia de garrapatas *R. Microplus* que causan problemas directos como daños en la piel, pérdida de sangre asociada con altas cargas parasitarias, lo que causa estrés permanente y anemia, pérdidas en la ganancia de peso, disminución de la producción de carne y leche e indirectos como la transmisión de las enfermedades *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, las que incrementan los gastos por programas de control y se crea resistencia a los garrapaticidas comerciales químicos. Sin embargo, existen reportes en otros países de estrategias biológicas de control de este insecto ectoparásito mediante el uso de hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae*, pero se desconoce el efecto de cepas nativas de *Metarhizium* spp. en el control de garrapatas en hatos bovinos en las condiciones específicas de la provincia de Pastaza.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la eficacia de aislamientos nativos de *Metarhizium* spp. en el control de garrapatas *Rhipicephalus microplus* del ganado bovino en condiciones *in vitro*.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de diferentes concentraciones de conidios del aislamiento nativo de *Metarhizium* spp. TI6301 en el control de teleoginas de la garrapata *R. microplus*, para determinar la dosis óptima de aplicación.
- Determinar la concentración letal media (CL50) y la concentración letal noventa (CL90) del aislamiento nativo de *Metarhizium* spp. TI6301, para el control microbiano de la garrapata *R. microplus* en laboratorio.

CAPITULO II

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.

2.1. GENERALIDADES DE LAS GARRAPATAS Y SU INCIDENCIA EN LA GANADERÍA.

Las garrapatas (Acari: Familia Ixodidae) son ectoparásitos hematófagos y se reconocen como importante ectoparásitos obligados al necesitar sangre durante una parte fundamental de su ciclo de vida (Polanco y Ríos 2016). Se han adaptado a la mayoría de los nichos terrestres del planeta y se han especializado en alimentarse de sangre de mamíferos, aves y reptiles (Domínguez, Rosario, Almazán, Saltijeral y De la Fuente, 2010).

Las garrapatas son consideradas como uno de los factores sanitarios más importantes que limita la ganadería en el trópico y que afectan el 80 % de la población bovina del mundo. Específicamente, *Rhipicephalus microplus* (anteriormente *Boophilus microplus*) es la garrapata que tiene un mayor impacto económico en México, Centroamérica, Suramérica y Australia (Polanco y Ríos 2016). El impacto negativo se debe a los daños en las pieles a causa de las picaduras, anemia por la pérdida de sangre y baja producción de leche y carne. Asimismo, son vectores de los patógenos *Babesiabovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* que causan la babesiosis y la anaplasmosis bovina pérdidas importantes en la producción de leche, carne y calidad de las pieles (Cruz, Cruz, Lezama, Vitela y Ángel, 2015).

2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

Las garrapatas son artrópodos que, junto con las arañas, los escorpiones y los ácaros, se encuentran ubicados taxonómicamente en la clase Arachnida, cuya característica principal es que en su vida adulta poseen cuatro pares de patas y su cuerpo está dividido en dos regiones, cefalotórax y abdomen (Polanco y Ríos 2016).

Las garrapatas *B. microplus* pertenece al Phylum Artropoda, a la clase Aracnida, al Orden Acarina, al Sub Orden Ixodoidea y a la familia Ixodidae conocidas como garrapatas duras (Treviño, 2013).

Entre los principales géneros de la familia Ixodidae se encuentran: *Ixodes*, *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* y *Rhipicephalus* (Polanco y Ríos 2016).

2.3. MORFOLOGÍA DE LAS GARRAPATAS.

A continuación, se describe las principales características morfológicas de las garrapatas de acuerdo a Treviño (2013).

Las garrapatas que pertenecen a la familia Ixodidae se caracterizan por poseer un escudo dorsal, el cual se presenta de manera completa en los machos y de manera incompleta en el caso de las hembras ya que esto permite que el abdomen crezca y se agrande lo suficiente para contener hasta dos centímetros cúbicos de sangre.

En todos los estados evolutivos es característica la presencia de un rostro terminal con hipostoma grande y dentado. Los palpos se insertan a los lados de las piezas bucales y se componen de cuatro segmentos, siendo el segundo de estas piezas importantes para la diferenciación de los géneros. En la parte anterior se localiza el capitulo y es visible dorsalmente, las placas especulares se localizan posterior a la coxa IV.

Los ojos se localizan en la región dorsal y están ubicados cada uno al lado del escudo, a nivel del segundo y tercer par de patas, se cree que los ojos solo perciben luz y movimiento, no todos los géneros de garrapata presentan ojos.

Hay un dimorfismo sexual ya que la hembra es de un tamaño mayor considerable en relación al macho. En esta familia Ixodidae existe un órgano adhesivo (ventosa) el cual le permite caminar sobre el animal y al mismo tiempo sostenerse sobre el mismo, dicha ventosa es llamada caruncular, ambulacro o pulvillum, y también se encuentran un par de garras que le permiten afianzarse mejor a cualquier superficie

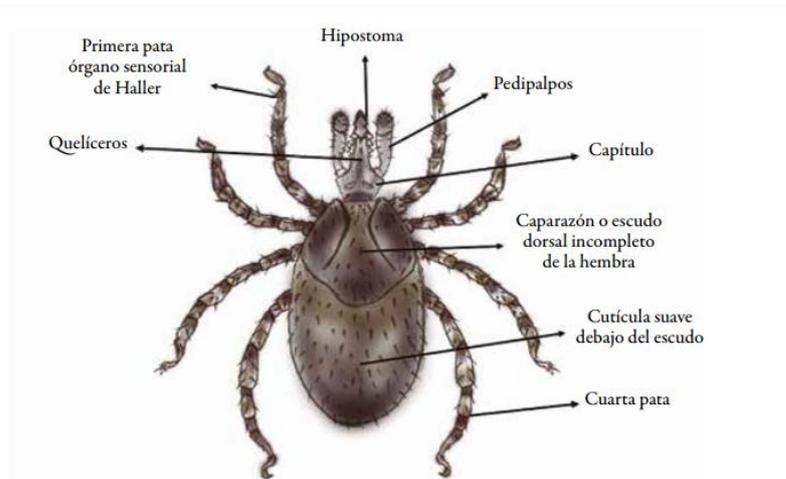


Figura 1. Garrapatas duras, partes principales de la hembra adulta.

Fuente: Elaborado por Diana Polanco Echeverry y Leonardo Alberto Ríos a partir de ilustraciones de Clara Velásquez.

2.4. CICLO BIOLÓGICO Y ECOLOGÍA DE LAS GARRAPATAS.

El ciclo de vida de las garrapatas duras se inicia con la eclosión del huevo ovipositado por la garrapata hembra grávida en un sitio húmedo y protegido, del cual emerge la larva. Esta permanece resguardada en el sitio donde emergió para evitar la desecación y, después de una semana aproximadamente, busca un hospedador del cual alimentarse. Para ello utiliza sus órganos sensoriales que son estimulados por olores, dióxido de carbono, luz, corrientes de aire, humedad y calor que indican la presencia del hospedador, al que acecha en las partes altas de la vegetación o se une a él de forma activa, cazándolo (Waladde, Young y Morzaria, 1996).

La larva se alimenta de la sangre del hospedador y cae al suelo para realizar la muda, en las garrapatas de dos y tres hospedadores, dependiendo de la temperatura y la humedad, les puede tomar desde cinco días a varias semanas; también puede mudar a ninfa sobre el primer hospedador en garrapatas de dos hospedadores y luego dejarse caer.

Las larvas de garrapatas de un hospedador, permanecen en él después de alimentarse y mudan luego de un corto periodo de tiempo. Las ninfas desarrolladas después de la muda de la larva, tiene sus mismas características, excepto que pueden vivir por más tiempo.

En las especies de garrapatas de uno y de dos hospedadores, la ninfa se alimenta de sangre del hospedador y muda sobre él en un corto periodo de tiempo, mientras en las garrapatas de tres hospedadores, la ninfa cae al suelo, donde puede mudar dentro de las próximas dos semanas o después de varios meses.

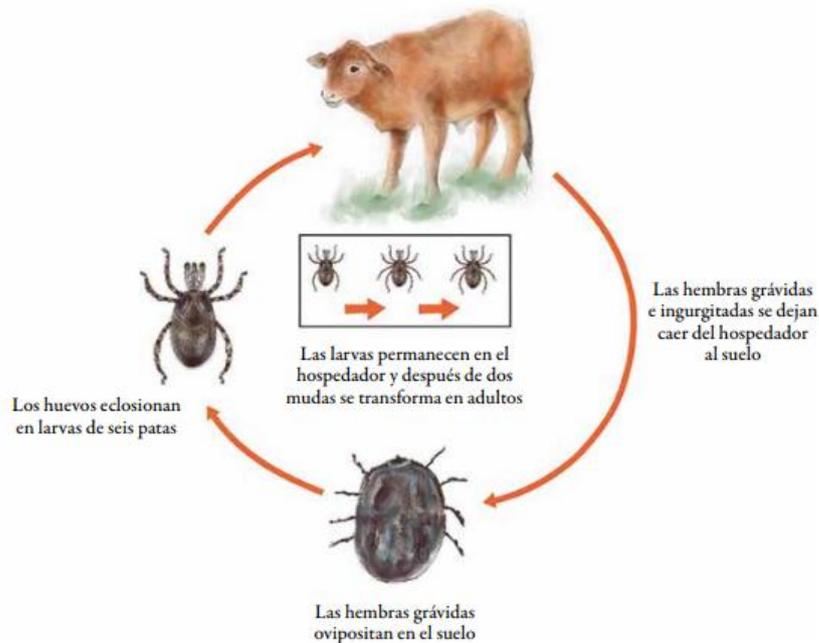


Figura 2. Ciclo de vida de las garrapatas de un solo hospedador.

Fuente:

Elaborado por Diana Polanco Echeverry y Leonardo Alberto Ríos a partir de ilustraciones de Clara Velásquez.

En el estado adulto se presenta la diferenciación sexual de las garrapatas; en las especies que mudan en el estado de ninfa sobre el hospedador, unas salen de la piel de la ninfa y se unen a otro sitio del hospedador como hembras, mientras otras garrapatas salen de la piel de la ninfa y se alimentan de sangre antes de diferenciarse a machos, proceso necesario para que ocurra la espermatogénesis. El comportamiento de los adultos de garrapatas que mudan en el suelo en el estado de ninfa (garrapatas de tres hospedadores), es similar a sus estados larvales y ninfales y solo se diferencia de éstos porque pueden permanecer por períodos largos de tiempo sin alimentarse. La cópula de las garrapatas duras se da sobre el hospedador, después de lo cual la garrapata hembra se repleta de sangre y cae a la vegetación, donde busca un lugar húmedo y protegido en el cual poner sus huevos, después de esto la garrapata hembra muere. La duración de este ciclo depende de la adaptación de las especies de garrapatas duras a la temperatura, la humedad y la disponibilidad de hospedadores (Anderson y Magnarelli, 2008).

2.5. ESTRATEGIAS DE CONTROL DE GARRAPATAS.

2.5.1.1. CONTROL QUÍMICO.

Las estrategias de control de esta parasitosis incluyen principalmente el uso extensivo e indiscriminado, de compuestos químicos ixodicidas de las familias de los organofosforados, piretroides sintéticos, amidinas, fenilpirazolonas y lactonas macrocíclicas, los cuales muestran actualmente diferentes niveles de resistencia en el campo, además de que su uso representa un riesgo ambiental y de salud pública ampliamente reconocido (Cruz, Cruz, Lezama, Vitela y Ángel, 2015).

Los químicos disponibles, que se utilizan para el tratamiento de ectoparásitos de importancia en medicina veterinaria, son sistémicos, todos los ixodicidas son neurotóxicos, y ejercen su efecto sobre el sistema nervioso de los ectoparásitos (Ojeda, Rodríguez, Galindo, Lezama y Cruz, 2011).

2.5.1.2. CONTROL BIOLÓGICO.

El control biológico basado en el uso de hongos entomopatógenos ha demostrado buena eficacia para el control de varios géneros de garrapatas, entre los que se encuentran *Amblyomma* y *Rhipicephalus*. Las especies de hongos entomopatógenos que han demostrado eficacia contra garrapatas son *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isariafarinosa* (= *Paecilomyces farinosus*) y *Lecanicilliumlecanii* (= *Verticillium lecanii*), siendo *B. bassiana* y *M. anisopliae* las especies más estudiadas y las que han demostrado mayor eficacia contra garrapatas (Rodríguez-Alcocer *et al.*, 2014).

En un estudio realizado por Cruz *et al.* (2015) al evaluar varios aislados de *Metarhizium anisopliae* determinaron que los aislados Ma135 y Ma133, presentaron alta patogenicidad con 100 y 94% de mortalidad de garrapatas. Posteriormente, en otro estudio en condiciones *in vitro* e *in vivo* determinaron que *M. anisopliae* produjo porcentajes que fluctuaron entre 50 y 100% en el control de todas las fases de desarrollo de *R. microplus*, por lo que constituye una alternativa para el control de garrapatas.

2.6. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.

En general la mayoría de los hongos entomopatógenos infectan al hospedante a través de la cutícula. El contacto entre la unidad infectiva del entomopatógeno y el insecto es indispensable para el inicio del proceso infeccioso. A continuación, se describe las principales etapas en el desarrollo de la micosis de acuerdo a Gómez, Zapata, Torres y Tenorio (2014). Las etapas en el desarrollo de la micosis son:

2.6.1. ADHESIÓN DE LA CONIDIA A LA CUTÍCULA DEL INSECTO.

Es el contacto de la unidad infectiva del hongo o conidia con la superficie del insecto. Las responsables de esta unión son las características físicas y químicas de las superficies tanto de la conidia como de la superficie del insecto.

Las zonas de adhesión, son las regiones intersegmentales o zonas blandas.

2.6.2. GERMINACIÓN DE LA CONIDIA.

Es el proceso mediante el cual, la conidia o espora sobre el integumento del insecto, germina emitiendo un tubo germinativo, formando luego un apresorio con el cual se fija en la cutícula, el tubo germinativo puede ser largo o corto y en algunos casos no llega a formarse. El tiempo de germinación dependiendo de la cepa es de 12 a 20 horas.

2.6.3. PENETRACIÓN DEL INTEGUMENTO.

La penetración de la cutícula del insecto, ocurre como resultado de la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica ejercida por el tubo germinativo. En este proceso participa un mecanismo físico y otro químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe la áreas esclerotizadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido de la zona de penetración, lo que facilita la penetración física. El tiempo de penetración es de 8 a 12 horas.

2.6.4. MULTIPLICACIÓN DEL HONGO EN EL HEMOCELE.

Una vez que el hongo llega al hemocele, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, en forma de levaduras o desarrollo por gemación, produciendo formas miceliales libres y unicelulares llamados blastosporas.

2.6.5. PRODUCCIÓN DE TOXINAS.

Los hongos producen toxinas que matan al insecto, aunque algunos hongos aparentemente no poseen toxinas y matan al insecto al consumir todos sus nutrientes. Las toxinas son sustancias de baja toxicidad para mamíferos pero muy tóxicos para artrópodos, causando la muerte del insecto debido a sus propiedades insecticidas, produciendo la degeneración de los tejidos producto de la pérdida de integridad estructural de las membranas seguido de la deshidratación de las células por pérdida de fluido, además actúan como inhibidores de las reacciones de defensa del insecto. Las toxinas producidas pueden ser enzimas, las cuales son secretadas en cantidades significativas tanto en el cuerpo del insecto como en medios de cultivo (lipasas, glicogenasas, amilasas y quitinasas), o metabolitos secundarios, cuya producción es una propiedad genética de los hongos, pudiendo ser afectada por diferentes factores como nutrientes, pH, temperatura, etc.

2.6.6. MUERTE DEL INSECTO.

La muerte del insecto infectado, ocurre generalmente antes de que el hongo colonice totalmente el hemocele del insecto, debido en gran parte a la acción de las toxinas. Con la muerte del insecto finaliza la fase parasítica y se inicia la fase saprofítica. El tiempo de la muerte depende de la cepa del hongo, del hospedante y de las condiciones ambientales.

2.6.7. COLONIZACIÓN.

Una vez muerto el insecto, el micelio invade todos los órganos y tejidos. Después de la colonización, en la mayoría de los casos los hongos producen sustancias antibacteriales que impiden la descomposición del insecto manteniéndolo como una momia, también

puede presentarse el cambio de color en el cadáver del insecto. El tiempo que dura la colonización es de 3 a 8 días, dependiendo de la cepa del hongo

2.6.8. EMERGENCIA.

Después de muerto el insecto, si las condiciones de humedad relativa ambiental son favorables, (\geq a 90%) el hongo emerge al exterior a través de la cutícula principalmente a través de las zonas menos esclerosadas, y esporulan sobre el cadáver produciendo inóculo para infectar a otros insectos. Si las condiciones externas no son favorables, el hongo permanece en el interior del insecto, protegido por el integumento, donde puede sobrevivir por algunos meses, hasta que lleguen las condiciones favorables para su esporulación.

2.6.9. ESPORULACIÓN.

Cuando las hifas emergen al exterior y si las condiciones de humedad relativa son favorables, ocurre la producción de conidios o esporas en un período de 24 a 48 horas. En esta fase el insecto muerto adquiere la coloración característica del hongo involucrado.

2.6.10. DISEMINACIÓN.

Las conidias o esporas del hongo que son las unidades infectivas se diseminan por medio del viento, lluvia, animales, hombre, buscando nuevos hospedantes para iniciar el proceso de infección. La dispersión puede ser un proceso activo o pasivo, dependiendo de las características de la conidia y del esporangio.

2.7. DESCRIPCIÓN DE LOS PRODUCTOS QUÍMICOS.

2.7.1. FICHA TÉCNICA DEL GARRAKILL®

Antiparasitario externo para especies; bovinos, equinos, caprinos y porcinos. Descripción: Piretroide emulsionable en agua, a base, de efectiva acción insecticida y garrapaticida. Composición: contiene; cipermetrina. Dosis: para baños de aspersión, diluir 1ml por cada litro de agua. Fumigar los animales con suficiente líquido dirigiendo la

boquilla en sentido contrario al pelo para mayor penetración. Use 2 a 3 litros por animal. Para baños de inmersión, 1 litro de Garrakill® por 1000 litros de agua. Reposición y refuerzo 1,5 L del producto para cada 1000 L de agua. Aplicación: En baños por aspersión o inmersión. Mantener soluciones adecuadas. Advertencias: Producto de toxicidad moderada grado II. No bañar animales menores a 2 meses o con piel lacerada. Utilice durante la aplicación: prendas de protección, guantes y mascarillas; evitar el contacto con la piel, ojos o inhalación del producto. Culminado el trabajo bañarse con abundante agua y jabón, cambiarse de ropa después del trabajo. Tiempo de retiro: Carne y leche: 2 días posteriores al baño (Brown, 2015).

2.7.2. FICHA TÉCNICA DEL AMITRAZ®.

Garrapaticida de uso externo en bovinos, solución tópica. Composición: amitraz al 20,8%. Características: Es un garrapaticida para combatir los diferentes tipos de garrapatas, así como los ácaros debido a su efecto residual, antiparasitario de uso externo. Indicaciones: Es un garrapaticida que pertenece al grupo de las amidinas, actúa sobre garrapatas resistentes a organofosforados y piretroides. Eficaz para el control de los géneros *Boophilus microplus* y *Amblyomma cajennense*. Actúa también como antisárnico pues permite eliminar los ácaros gracias a su efecto residual y ovicida. Para el control de garrapatas en bovinos efectivo contra la sarna de los ovinos, efecto marcado sobre todos los estados larvarios, efecto residual por un tiempo de 9 días. Dosis y vía de administración: se usa exclusivamente en baños de aspersión en dilución de 1 ml por cada litro de agua. Para una bomba de 20 litros, utilizar 20 ml del producto, cantidad para bañar 4-5 animales adultos. Se recomienda una frecuencia de baño para el caso de *Boophilus* cada 21 a 30 días y con lo que se logra romper el ciclo biológico y controlar las reinfestaciones. Precauciones: No usar en baños de inmersión, utilizar equipo de protección adecuado cuando manipule y aplique el producto, no desechar residuos del producto cerca de fuentes de agua para consumo humano o animal, no tratar animales menores de 1 mes. Tiempo de retiro: carne y leche hasta 72 horas después del último tratamiento (INDUFAR, 2015).

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. LOCALIZACIÓN.

La investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica, ubicado en el cantón Pastaza, km 2, 1/2, vía Tena. Las condiciones ambientales se mantuvieron a una temperatura promedio de 25°C. y a una humedad relativa de 85%.

3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN.

Esta es una investigación explicativa porque se evaluó la eficacia de distintas concentraciones del aislamiento nativo TI6301 de *Metarhizium* spp. Y dos químicos en el control de garrapatas adultas en condiciones de laboratorio.

3.3. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

Se estableció un diseño completamente aleatorizado, con 8 tratamientos: cinco concentraciones del aislamiento nativo de *Metarhizium* spp. (1×10^6 ; $0,5 \times 10^7$; 1×10^7 ; $0,5 \times 10^8$ y 1×10^8 conidios.mL⁻¹, dos tratamientos químicos (Amitraz® en dosis de 1mL.L⁻¹ de agua y Garrakill® en dosis de 1mL.L⁻¹de agua) y un tratamiento control (con agua destilada estéril+Tween 80® al 0,1%). Se utilizó 3 réplicas por cada tratamiento. Cada réplica se conformó con 10 garrapatas adultas, con un total de 30 garrapatas por tratamiento.

3.4. MÉTODOS DE LA INVESTIGACIÓN.

El método de investigación fue experimental en condiciones de laboratorio, ya que se midió la causa y efecto a través de las variables independiente y dependiente respectivamente.

3.4.1. SELECCIÓN DEL AISLAMIENTO NATIVO DE *METARHIZIUM* SPP. PARA EL ENSAYO.

Para este estudio se utilizó el aislamiento nativo de *Metarhizium* spp. TI6301, conservado en el laboratorio de Microbiología de la UEA, el cuál fue seleccionado de entre veinte aislamientos como el más efectivo en el control de ninfas de *Mahanarva andigena* y adultos de picudos de la caña de azúcar *Metamasius hemiperus*, seleccionado en el proyecto “Selección de hongos entomopatógenos nativos”.

3.4.2. OBTENCIÓN DE LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES DEL AISLAMIENTO NATIVO DE *METARHIZIUM* SPP. TI6301.

Para obtener las distintas concentraciones de este aislamiento el conteo se realizó utilizando la metodología sugerida por Monzón (2001). se tomó un gramo de arroz colonizado por el aislamiento TI6301 y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada estéril y posteriormente se agitó en un vortex durante 3 minutos, hasta que se homogenice completamente la suspensión.

A esta suspensión se determinó su concentración de conidios mediante una cámara de Neubauer con ayuda de un microscopio óptico con aumento de 40x. A partir de esta determinación se realizó diluciones mediante la fórmula volumétrica $V_1C_1=V_2C_2$ para la obtención de las cinco concentraciones requeridas para la inoculación a las garrapatas.

3.4.3. COLECTA DE GARRAPATAS (TEOLOGINAS).

Las garrapatas se obtuvieron directamente de la piel de bovinos con una pinza entomológica, éstas se desprendieron al contrario del pelo, mediante movimientos suaves de torsión, para evitar la ruptura del capítulo con las piezas bucales, que son partes vitales de las garrapatas. Las garrapatas colectadas se almacenaron en tubos de ensayo cerrados con tapa de rosca para su transporte a laboratorio método descrito por Alvarado y Dixon (2010).

3.4.4. INOCULACIÓN DE TRATAMIENTOS.

Una vez colectadas las garrapatas en campo, en el laboratorio fueron desinfectadas por inmersión durante 30 segundos en hipoclorito de sodio al 0,1%, seguido de 1 lavada con

agua destilada estéril. Posteriormente, se colocaron 10 garrapatas del mismo tamaño en cada cámara húmeda, que consistía de placas de petri de 90mm de diámetro con papel filtro en el fondo, un algodón humedecido con agua destilada estéril. Una vez colocadas las garrapatas en la cámara húmeda se procedió a inocular 1mL. de cada tratamiento a cada grupo de 10 garrapatas.

Posteriormente en cada tratamiento se registró la mortalidad acumulada total hasta el día 15 después de la inoculación. Se determinó la mortalidad de los insectos por cada tratamiento a través de la fórmula de Tiertó (1994).

$$\% M = \frac{NIMT}{NTIT} * 100$$

Donde:

%M: porcentaje de mortalidad

NIMT: número de insectos muertos en el tratamiento

NTIT: número total de insectos en el tratamiento

Para la mortalidad corregida de los tratamientos en estudio se aplicó la fórmula de Abbott (1925).

$$MC = \frac{MTr - MTe}{100 - MTe}$$

Donde:

MC: Mortalidad corregida

MTr: Mortalidad del tratamiento

MTe: Mortalidad del control

3.4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En cada tratamiento se registró la mortalidad acumulada total hasta el día 15 después de la inoculación.

Para comparar los tratamientos en cuanto a mortalidad acumulada y corregida se realizó un análisis de varianza de clasificación simple y prueba de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0,05$).

Para el análisis se empleó el programa INFOSTAT Versión 2018.

Con los datos de mortalidad del último día de evaluación se determinó la concentración letal 50 (CL₅₀) y la concentración letal noventa (CL₉₀) del aislamiento nativo de *Metarhizium* spp. TI6301, mediante el análisis Probit, con el uso del programa SPSS Versión 22.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DEL AISLAMIENTO NATIVO DE *METARHIZIUM*SPP. Y GARRAPATICIDAS QUÍMICOS EN EL CONTROL DE GARRAPATAS ADULTAS (TELEOGINAS).

En la figura 1, se muestra que el tratamiento con la mayor concentración 1×10^8 conidios. ml^{-1} , tuvo un incremento progresivo en la mortalidad de garrapatas adultas a partir del día 11, seguido de la concentración $0,5 \times 10^8$ conidios. ml^{-1} , que tuvo un incremento a partir del día 13. Estas dos concentraciones provocaron las mayores tasas de mortalidad acumulada hasta el día 15. Los dos químicos evaluados provocaron mortalidades por debajo del 20% de mortalidad en comparación a las concentraciones del aislamiento nativo.

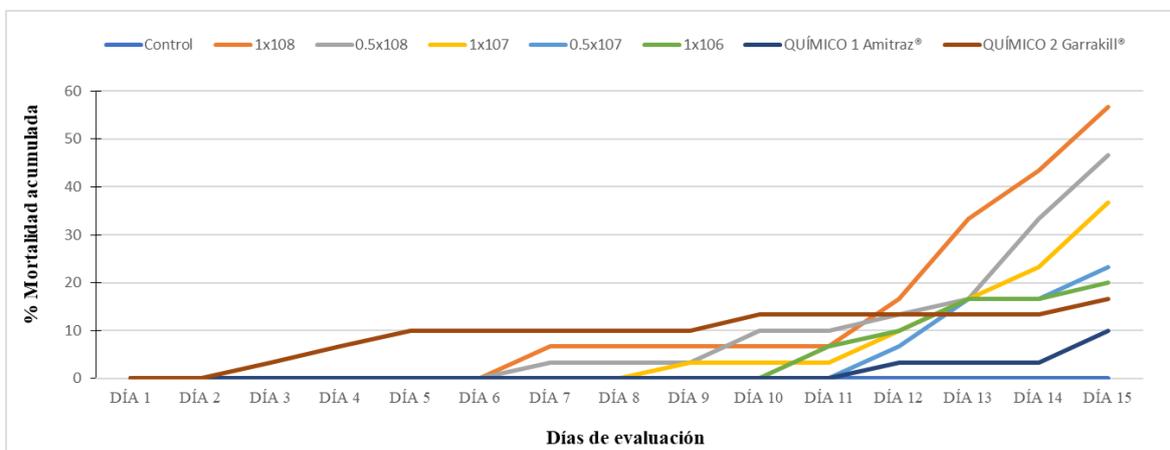


Figura 1. Comportamiento de la mortalidad acumulada diaria de garrapatas adultas por efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos.

En cuanto al control durante los 15 días de evaluación no presentó mortalidad en ninguna repetición lo que demuestra que el experimento estuvo bien manejado. En un estudio realizado por Arguedas, Álvarez y Bonilla (2008). Al evaluar la eeficacia del hongo

entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en el control de *B. microplus*, establecieron que la mortalidad en el tratamiento control debe ser $\leq 15\%$.

En la figura 2, se observa la mortalidad acumulada al día 15 de la evaluación, donde la concentración 1×10^8 conidios.mL⁻¹, provocó el 56% de mortalidad de garrapatas adultas (teologinas), sin diferencias significativas con la concentración $0,5 \times 10^8$ conidios.mL⁻¹, que provocó el 46,7%. Los demás tratamientos presentaron mortalidades por debajo del 40%. Los tratamientos químicos fueron los que presentaron las menores mortalidades de garrapatas (teologinas) 16,7% (químico 2 Garrakill®) y 10% (químico 1 Amitraz®).

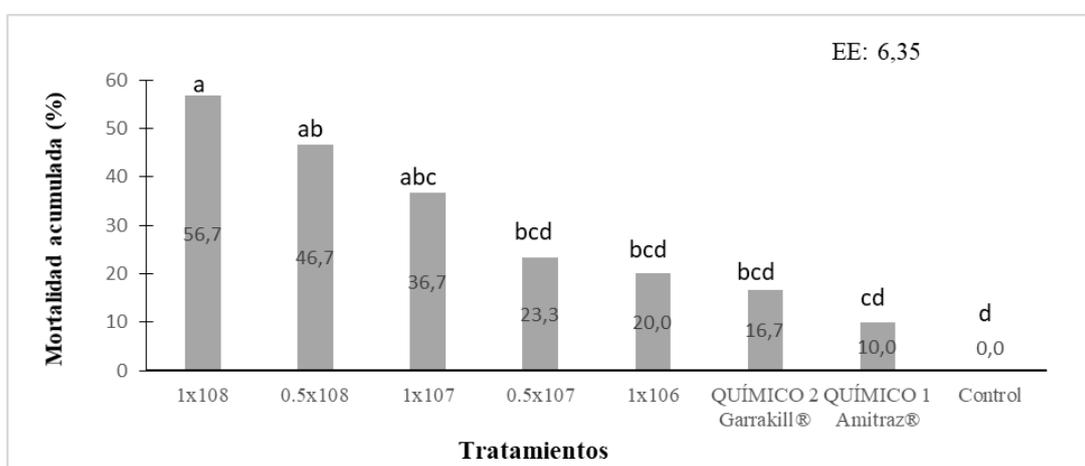


Figura 2. Mortalidad acumulada (%) de garrapatas adultas *B. microplus* causada por diferentes concentraciones de *Metarhizium* spp. y garrapaticidas químicos a los 15 días de la inoculación.

Los resultados obtenidos en el presente estudio con la concentración 1×10^8 /conidios.mL⁻¹ del aislamiento nativo de *Metarhizium* spp. TI6301, son superiores a los reportados por Bautista *et al.* (2017) quienes reportaron una mortalidad del 47.71% a los 10 días con la misma dosis evaluada en el presente estudio.

La eficiencia del uso del Amitraz® la dosis de 1 mL.L⁻¹ demostró un porcentaje de mortalidad de 10%, resultados que no coinciden con los de Bautista *et al.* (2017), quienes observaron una mortalidad del 20.75%, pero una dosis de 2 mL.L⁻¹, sin embargo, estos dos resultados son bajos para lograr un control eficiente de garrapatas con este tipo de

garrapaticida químico que se encuentra comercializando a nivel de la provincia de Pastaza en los distintos centros veterinarios.

Con respecto a la mortalidad corregida la mayor concentración 1×10^8 conidios.mL⁻¹ se mantiene con el mayor porcentaje de mortalidad (56,7%) con respecto a los demás tratamientos debido a que en el tratamiento control la mortalidad fue de 0%.

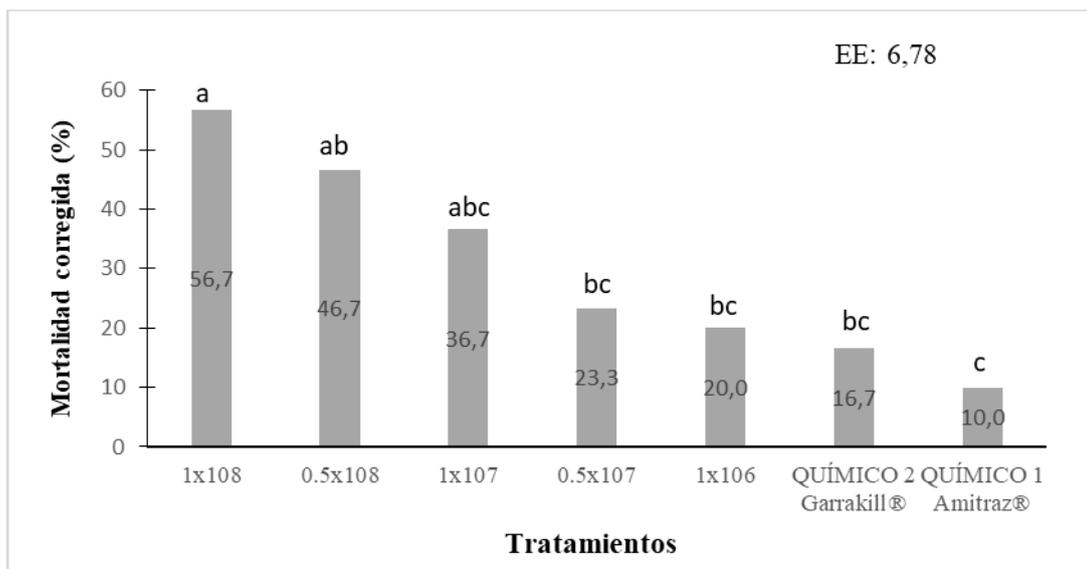


Figura 3. Mortalidad corregida (%) de garrapatas adultas *B. microplus* causada por diferentes concentraciones de *Metarhizium* spp. y garrapaticidas químicos a los 15 días de la inoculación.

Los resultados de este estudio demostraron que el tratamiento con la concentración 1×10^8 conidios.mL⁻¹ del aislamiento nativo *Metarhizium* spp., presenta una buena eficacia para el control de garrapatas adultas. Esto se debe a que los hongos entomopatógenos han demostrado tener gran potencial para el control biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Ojeda, Rodríguez, Galindo, Lezama y Cruz, 2011; Fernández, Bittencourt y Roberts, 2012).

4.2. DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀) Y DOSIS LETAL NOVENTA 90(DL₉₀) DEL AISLAMIENTO NATIVO DE *METARHIZIUM*SPP.

En la tabla 1, se puede observar que con un 95% de confianza que la dosis letal media efectiva (DL₅₀) para el día 15 es de $6,01 \times 10^7$ conidios.mL⁻¹, si se desea alcanzar una mortalidad de 90% para el mismo periodo de tiempo sería necesario incrementar la dosis a $1,72 \times 10^{10}$, lo que además incrementa la probabilidad de controlar mayor número de insectos.

Tabla 1. Análisis Probit del efecto del aislamiento nativo de *Metarhizium* spp., sobre garrapatas adultas *B. microplus*, al día 15 de la aplicación.

Aislamiento nativo de <i>Metarhizium</i> spp.	Pendiente	Intercepto	Dosis Letal (Conidios.mL ⁻¹)					
			DL50	Límite inferior al 95%	Límite superior al 95%	DL90	Límite inferior al 95%	Límite superior al 95%
TI6301	0,522	-4,057	$6,01 \times 10^7$	$2,28 \times 10^7$	$6,88 \times 10^8$	$1,72 \times 10^{10}$	$1,14 \times 10^9$	$3,51 \times 10^{14}$

CAPITULO V.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio demostraron que la concentración 1×10^8 conidios.mL⁻¹ del aislamiento nativo TI6301 de *Metarhizium* spp. constituye una alternativa ecológica para el control de garrapatas.
- Para alcanzar una mortalidad de 90% de la población de individuos tratados al 95% de confianza en un periodo de quince días es necesario incrementar la dosis a $1,72 \times 10^{10}$ conidios.mL⁻¹ aislamiento nativo TI6301 de *Metarhizium* spp.

RECOMENDACIONES

- Es necesario realizar más estudios en el tiempo con la finalidad de mejorar la eficacia del hongo, el cual presenta una buena alternativa para el control de *R. microplus* en la provincia de Pastaza.
- Evaluar otros garrapaticidas químicos a diferentes dosis en el control del garrapatas adultas (teleoginas), con la finalidad de disponer de al menos un garrapaticida químico efectivo para sugerir su aplicación.

CAPITULO VI

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbott, W. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18 (2): 265-267, 1925. ISSN: 1938-291X
2. Alvarado Artola, Reynaldo de Jesús y Dixon Méndez, José Bartolo (2010) Identificación de las principales especies de garrapatas que afectan al ganado bovino en el municipio de Mulukuku, RAAN. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Agraria, UNA. Managua, Nicaragua, 1-37.
3. Anderson, J.F., Magnarelli, L.A. (2008). Biologyofticks. *InfectDisClin North Am.* 22(2):195-215.
4. Ángel, C.A., Lezama, R., Molina, J., Pescado, A., Skoda, S.R., Cruz, C. (2010). VirulenceofMexicanisolatesofentomopathogenicfungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) up on*Rhipicephalus = Boophilusmicroplus*(Acari: Ixodidae) larvae and theefficacyofconidiaformulationsto reduce larval tickdensityunderfieldconditions. *VetParasitol.* 170:278-86.
5. Arguedas, M., Álvarez, V., Bonilla, R. (2008). Eficacia del hongo entomopatógeno*Metharriizumanisopliaeen* el control de *Boophilusmicroplus*(Acari: Ixodidae). *Agronomía Costarricense.* 32(2): 137-147.
6. Bautista, A., Pimentel, R., Gómez, A. (2017). Control biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* con hongos entomopatógenos. *Ciba Revista Iberoamericana de las Ciencias Biologicas y Agropecuarias.* 6(12). URL: <http://www.ciba.org.mx/index.php/CIBA/article/view/68/325>
7. Brown James Pharma (2015). Quito, Ecuador: [citado el 22 enero del 2019]. Disponible desde: http://www.jamesbrownpharma.com/sites/default/files/Garrakill_0.pdf
8. Camargo, M., Golo, P., Angelo, I., Perinotto, W., Sá, F., Quinelato, S., Bittencourt, V. (2012). Effectofoil-basedformulationsofacaripathogenicfungito control *Rhipicephalusmicroplusticks*underlaboratoryconditions. *Veterinary Parasitology.*188: 140– 147.
9. Cruz, A., Cruz, C., Lezama, R., Vitela, I., Angel, C. (2015). Selección de aislados de hongos entomopatógenos para el control de *Rhipicephalusmicroplus* (Acari: Ixodidae). *Tropical and Subtropical Agroecosystems.* 18: 175-180

10. Domínguez, D., Rosario, R., Almazan, C., Saltijera, J., De la Fuente, J. (2010). *Boophilus microplus*: aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal. Revista. Tropical and Subtropical Agroecosystems.12: 181-192.
11. Espinoza, D. (2017). Prevalencia de babesiobovis y babesiabigemina en explotaciones ganaderas del sector este de la provincia Zamora Chinchipe (tesis pregrado). Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador.
12. Fernandes, E., Bittencourt, V., Roberts, D. (2012). Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. Experimental Parasitology 130: 300- 305.
13. Gómez, H., Zapata, A., Torres Del Águila, E., Tenorio, M. (2014). Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Perú. SCB.
14. Industria Farmaceutica (2015). Garrapaticida de uso externo en bovinos, Quito, Ecuador [citado el 22 enero del 2019]. Disponible desde: <http://www.grpharma.com.ec/indufar/index.php/productos/terapeuticas/desinfectantes/desinfectantes/item/105-amitraz-208.html>
15. Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas. 63: 95-103.
16. Muñoz, T. (2016). Babesiosis bovina (*Babesiosis bovis* y *Babesiabigemina*), una enfermedad hematozoárica. Centro de Biotecnología. 5(01):21-30.
17. Ojeda, M. Rodríguez, R. Galindo, E. Lezama, R. Cruz, C. (2011). Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso de hongos entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revisión - Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 2(02):177-192.
18. Pérez, M. (2015). Validación del efecto de los hongos entomopatógenos *Beauveria Bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium Anisopliae* (Metsch) Sorokin, reguladores biológicos de estados parasitarios de la garrapata *Rhipicephalus Microplus* (Arachnida: Ixodidae). Congreso Colombiano de Entomología. Sociedad Colombiana de Entomología– SOCOLEN, Medellín, Colombia. 257-269.
19. Polanco, D., Ríos, L. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria, Mosquera (Colombia). 17(1):81-95.

20. Rodríguez, C., Pulido, N. (2015). Eficacia de extractos vegetales sobre la garrapata adulta *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y su oviposición. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 20(4): 375-388.
21. Rodríguez-Alcocer, U., Rodríguez-Vivas, R., Ojeda-Chi, M., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R. (2014). eficacia de la mezcla de dos cepas de *Metarhiziumanisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) para el control de *Rhipicephalus microplus* en infestaciones naturales en bovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 17 (2):223-229.
22. Rodríguez-Vivas, Roger Iván, Rosado-Aguilar, José Alberto, Ojeda-Chi, Melina Maribel, Pérez-Cogollo, Luis Carlos, Trinidad-Martínez, Iris, & Bolio-González, Manuel Emilio. (2014). Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*. 1(3):295-308.
23. Tiertó, N. (1994). The ability of powders and slurries from ten plant-species to protect. Stored grain from attack by *Prostephanustruncatus* Horn (Coleoptera: Bostrichidae) y *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal Stored Prod. Res.*, 30 (4): 297–301, 1994. ISSN: 1119-8362.
24. Treviño, R. (2013). Evaluación de resistencia a ixodicidas y efectividad de la vacuna BM86 en el grado de infestación por garrapata *Boophilus* sp. en las razas de ganado bovino charolais, simmental, brangus negro y comercial. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
25. Vasco, K. (2013). Estandarización de la técnica de análisis de fusión de alta resolución para la detección de *Babesia* en garrapatas utilizando polimorfismos de nucleótidos. (Tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
26. Vázquez, Z. (2010). Garrapatas que afectan al ganado bovino y enfermedades que transmiten en México. Morelos – México.
27. Waladde, S.M., Young, A.S., Morzaria, S.P. (1996). Artificial feeding of ixodid ticks. *Parasitol Today*. 12(7):272-278.

CAPITULO VII

ANEXOS



Colecta de garrapatas.



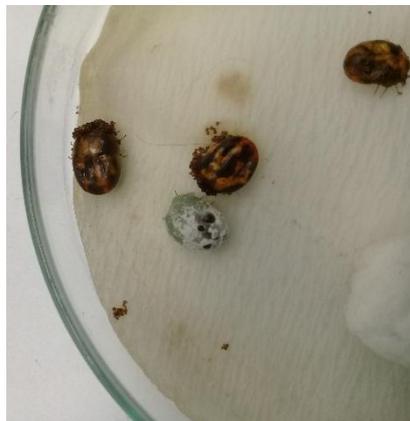
Transporte de las garrapatas en tubos de ensayo.



Adecuacion y esterilizacion del area de investigaciòn.



Presencia de micosis en las garrapatas.



Desarrollo de esporas en el ectoparasito.