

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA-LEON

FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE AGROECOLOGIA



Evaluación de la Patogenicidad y Esporulación del hongo Entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch Sorokin) cepa (Metagreen) en control de garrapata del ganado (*Boophilus microplus*) en su fase parasítica en estado ninfal en 2 etapas: en el Laboratorio de hongos Entomopatógenos de la UNAN - León y Finca Las Mercedes del Municipio de Malpaisillo.

Previo a optar al título de Ingeniero en Agroecología Tropical.

Presentado por:

Br. Marcos Eugenio Hurtado Moreno

Br. Rosa Erlinda Juarez Baca

Tutor:

Lic. Marcia del Socorro Gómez Vega

Asesor:

MSc. Henry Harold Doña Padilla

León, 2012

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO.....	i
DEDICATORIA.....	ii.iii
Resumen.....	iv
I. INTRODUCCION.....	1
II. OBJETIVOS.....	2
III. Hipótesis.....	3
IV. MARCO TEÓRICO.....	4
4.1Hongos entomopatógenos.....	4
4.1.1. Aspectos generales.....	5
4.2. Control Microbial.....	5
4.3. Hongo Metarhizium anisopliae.....	5
4.3.1. Características.....	5,6
4.4. Taxonomía.....	6
4.4.1. Ciclo de vida.....	6,7
4.4.2. Patogenicidad y Virulencia.....	7
4.4.3. Modo de Acción.....	7
4.4.3.1. Germinación de las Conidias.....	7
4.4.3.2. Formación de Apresorio.....	8
4.4.3.3. Penetración.....	8
4.4.3.4. Colonización.....	8
4.4.3.5. Reproducción del patógeno.....	8
4.4.3.6. Toxinas.....	8
4.4.3.7. Modo de Entrada.....	9
4.4.4. Sintomatología.....	9
4.4.5. Toxicidad	9
4.4.6. Ventajas de los hongos entomopatógenos.....	9
4.4.7. Hongos en el control de insectos.....	10

4.4.8. Impacto ambiental de hongos entomopatógenos.....	10
4.4.9. Taxonomía de la garrapata.....	11
4.5.0. Ciclo de vida de las garrapatas. (<i>Boophilus microplus</i> sp.....	11, 12
4.5.1. Trasmisión de enfermedades entre la garrapata y su huésped bovino.....	12
4.5.2. Periodo de incubación.....	12
4.5.3. Susceptibilidad del ganado vacuno a la infestación y a la enfermedad.....	12, 13
4.5.4. Daños al animal infestado por garrapata.....	13
4.5,5 Estudios realizados.....	14
V.MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5. Variables a medir.....	15
5.1. Colección de insectos.....	15,16
5.2. Conteo de Conidias.....	16
5.3. Prueba de patogenicidad.....	16
5.4. Prueba de Viabilidad.....	17
5.5. Montaje del bioensayo.....	17
5.6. Medición de esporulación.....	17
5.7. Producción de Hongo.....	17,18
5.7.1 Preparación de extracto de malta.....	18
5.7.2. Preparación de suspensión fungosa.....	18
5.7.3. Elaboración de bolsas.....	18
5.7.4. Inoculación de las bolsas.....	18
5.7.5. Control de calidad.....	18,19
5.7.6. Resultados de conteo de Conidias.....	19
5.7.7. Prueba de viabilidad y porcentaje de esporulación.....	19,20
VI. Resultados y Discusión.....	21,25
VII. CONCLUSIONES.....	26

VIII. Recomendaciones.....	27
IX. BIBLIOGRAFIA.....	28, 29
Anexos.....	30, 35

i. AGRADECIMIENTO

A nuestro tutor Lic. Marcia Gómez por su apoyo, interés y ayuda a nosotros en la realización de este trabajo de investigación.

A nuestro asesor MSc. Henry Doña por su apoyo incondicional en el desarrollo de nuestra tesis.

Al Laboratorio de Hongos Entomopatógenos de la UNAN- LEON por las prestaciones y servicios brindados para realizar este trabajo.

Al Sr. Alfredo González por permitir llevar a cabo nuestro trabajo de tesis en su finca Las Mercedes.

A todas aquellas personas que de una u otra forma se vieron involucradas para que este trabajo se llevara a cabo.

Marcos Eugenio Hurtado Moreno

Rosa Erlinda Juárez Baca

ii. DEDICATORIA

A Dios, por darme la sabiduría y fortaleza para concluir mis estudios y permitirme cumplir mis metas y anhelos.

A mis padres, Sra. Virginia Moreno y Leonel Morazán, por todo el apoyo económico y moral.

A los profesores Lic. Marcia Gómez y MSc. Henry Doña, por trasmitirme sus conocimientos y ayuda incondicional.

Marcos Eugenio Hurtado Moreno

iii. DEDICATORIA

A Dios por brindarme fortaleza para poder realizar las actividades en mi diario vivir.

A mis padres Sr. Cruz Evelio Juárez Ruiz y Sra. Judith Edubije Baca García por su apoyo incondicional.

A mis tutores Lic. Marcia Gómez y MSc. Henry Doña por darnos la asistencia y el conocimiento necesario para elaborar este trabajo.

Rosa Erlinda Juárez Baca

iv. Resumen

El objetivo de nuestro trabajo es Evaluar la patogenicidad y esporulación de *Metarhizium anisopliae* (Metsch Sorokin) cepa Metagreen en el control de ninfas de garrapatas *Boophilus Microplus* de ganado bovino en el cual se determino la susceptibilidad de estos organismos al hongo Entomopatógenos . El trabajo se realizó en 2 etapas, en la etapa de laboratorio se utilizaron 90 ninfas de garrapatas, extraídas del ganado las cuales se inocularon con la cepa Metagreen del hongo para realizar la prueba de patogenicidad haciendo uso de la técnica de inmersión, se hicieron 3 bioensayos de 30 ninfas cada uno, evaluándolo cada 3 días, midiendo la mortalidad y esporulación en términos de porcentaje. La mortalidad del primer bioensayo, se dió a los 3 días, después de infestadas, con 65% de ninfas muertas, el segundo con 60% ninfas muertas y el tercero con 83%. El mayor porcentaje de esporulación del primer bioensayo se dió a los 10 días con 95%, el segundo 90 %, y el tercero 100%. La prueba de viabilidad se realizó colocando 5 gotas de suspensión del hongo en un plato petri con PDA con medio de cultivo se colocó en el incubador a una temperatura de 20 a 27 °c. A las 24 horas se realizó la lectura obteniendo un 95 % de germinación bajo las condiciones del laboratorio, así se determino la presencia del hongo. La evaluación de campo se realizó en la finca la Mercedes ubicada a 1 km del municipio de Malpaisillo donde se aplicó una dosis de 2 bolsas por bombada, esta con capacidad de 20 litros se utilizó una población de 30 animales en cada una de las 3 aplicaciones, se trabajo con toros, vacas, terneros, Estos estaban infestados en niveles de un rango de alto, medio, y leve. Estos parámetros se midieron con el nivel de infección que presentaron los bovinos antes y después de cada aplicación. Cabe mencionar que estas se realizaron en época de lluvia. Se recolectaron ninfas después de cada aplicación, en la primera aplicación de 50 infestadas el 94 % murieron a los 5 días, en la segunda aplicación de 60 se murieron el 86.6 % a los 3 días en la tercera aplicación de 40 se murió el 87.5 % a los 5 días. En la etapa de campo se midió la esporulación del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metsch Sorokin) cepa (Metagreen) en las tres aplicaciones de dicho hongo obteniendo la mayor esporulación en la aplicación 3 con un 90% de esporulación, la aplicación 1 con 85% y la aplicación 2 obtuvo un 80% de esporulación estas obtenidas a los 10 días después de muertas las garrapatas. Se comprobó que murieron a causa del hongo al observar la esporulación y coloración respectiva a *Metarhizium anisopliae*.

V. INTRODUCCION

La producción ganadera en Nicaragua es una de las actividades bases de la economía, para lograr que esta sea un rubro sostenible se ha aplicado muchas alternativas para mejorar, un factor que incide es el contagio de ectoparásitos, garrapatas (*Boophilus microplus*).

Estos organismos afectan severamente la producción bovina debido a que son causantes de enfermedades que disminuyen el rendimiento comercial del ganado.

Una nueva técnica de control de estos ectoparásitos es el uso de *Metarhizium anisopliae*, para su control. Este hongo posee alto grado de patogenicidad, lo que le permite acabar con la presencia de garrapatas.

El uso de hongos Entomopatógeno como *Metarhizium anisopliae* se ha usado para ejercer control sobre garrapatas (*Boophilus microplus*) del ganado bovino. Lo que será de ayuda para promover el uso de productos biológicos.

En Nicaragua en 1986-87 se reportó la incidencia natural de hongos Entomopatógenos entre ellos: *Nomuraea*, *Aspergillus*, *Entomophthora*, *Hirsutella*, *Fusarium*. En este mismo año se reportó la incidencia de (*Dalbullus maidis*) chicharrita del maíz con altos niveles de epizootias naturales de *Metarhizium anisopliae*. Se inicia la colecta de aislados de *Beauveria* y *Metarhizium* de suelo e insectos infectados (CNPB) financiado por GTZ.

En 1990 Castiñeiras et. Al. Realizaron pruebas de virulencia de aislados de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre adultos de *Cosmopolites sordidus* mediante la inmersión de estos en suspensión acuosa y llegaron a obtener mortalidades en ambos hongos arriba del 50%. En 1997-98 UNA y UNAN-León asumen la responsabilidad con hongos entomopatógenos. (UNA, 2000)

La ejecución de este trabajo tiene como enfoque principal comprobar la patogenicidad del hongo *Metarhizium anisopliae* sobre garrapatas del ganado (*Boophilus microplus*) además surge como una alternativa para facilitar a los ganaderos nuevas opciones en la regulación de las poblaciones de garrapatas, con productos biológicos otorgando a los ganaderos mayores oportunidades para que sus productos estén libres de alguna perturbación que incida en su comercialización.

II. OBJETIVOS

General

Evaluar la Patogenicidad y Esporulaci3n del hongo Entomopat3geno *Metarhizium anisopliae* (*Metsch Sorokin*) *cepa* (Metagreen), sobre ninfas de garrapatas del ganado (*Boophilus microplus*) en condiciones de laboratorio de hongos Entomopat3genos de la UNAN□LEON y en la finca Las Mercedes.

Específico

Determinar la susceptibilidad de las ninfas de garrapata (*Boophilus microplus*) al Hongo Entomopat3geno *Metarhizium anisopliae* (*Metsch Sorokin*) *cepa* (Metagreen).

Determinar el porcentaje de Esporulaci3n del hongo *M. anisopliae* (*Metsch Sorokin*) *cepa* (Metagreen) en ninfas de garrapatas (*Boophilus microplus*).

III. Hipótesis

Ho: La cepa Metagreen de *Metarhizium anisopliae* (Metsch Sorokin) es patogénica para las ninfas de garrapatas de ganado bovino *Boophilus Microplus*.

H1: La cepa Metagreen de *Metarhizium anisopliae* (Metsch Sorokin) no es patogénica para las ninfas de garrapatas de ganado bovino *Boophilus Microplus*.

IV. MARCO TEÓRICO

El sector ganadero en Nicaragua es de mucha importancia, no solo por representar grandes divisas y generar empleos si no porque se reproduce naturalmente y se le da poco valor agregado, obteniendo así ganancias significativas.

El proceso productivo se ha visto afectado por la incidencia de Ectoparásitos como garrapatas (*Boophilus microplus*). Las vacunas contra *B. microplus* están indicadas para el control de poblaciones de garrapatas, pero no para la protección a corto o medio plazo de las reses individuales contra las infestaciones, ni para derribar inmediatamente las garrapatas que ya infestan el ganado en un momento determinado. La mayoría de los productos contra las garrapatas contienen garrapaticidas de contacto (también llamados acaricidas o ixodicidas) pertenecientes a los organofosforados, piretroides o amidinas. El *fipronil* también tiene actividad de contacto. Son eficaces contra las larvas, las ninfas y los adultos. Muchos de ellos también controlan a otros parásitos de los bovinos como moscas, piojos, ácaros, etc.

Una nueva alternativa de manejo de estas es implementando el control biológico, este tipo de alternativas se ha aplicado a la agricultura, ahora se evalúa en el sector ganadero, como el uso de *hongos entomopatógenos*.

4.2. Control biológico.

El control Biológico es usado al emplear organismos como enemigos naturales, nativos e introducidos (predadores, parásitos, parasitoides y patógenos de plagas) y otros organismos

Benéficos, con el fin de reducir las poblaciones plagas, esta metodología resulta ser ecológicamente sostenible para la actividad agrícola en general. La implementación de estas estrategias no solo reduce los efectos de la agricultura convencional si no también nos permite crearnos nuevas metodologías de producción en un Agroecosistema. (Leoucona.R.1995)

4.1 Hongos entomopatógenos

Los Hongos Entomopatógenos son un grupo de microorganismos ampliamente estudiados en todo el mundo. Ellos tienen la particularidad de parasitar a diferentes tipos de Artrópodos (insectos y ácaros) y de encontrarse en los hábitats más variados, ya sea acuático y terrestre y dentro de estos, en cultivos anuales, semiperennes y perennes.

Su importancia dentro de un programa de manejo integrado de plagas es demostrada por la utilización que se les ha dado en distintos países. Actualmente están siendo estudiados con más Auge *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecani*, *Paecilomyces fumosus* □ *roseus*. (Leoucona.R.1995)

4.1.1. Aspectos generales

Los hongos entomopatógenos poseen extrema importancia en el control de ectoparásitos, virtualmente todos los ectoparásitos son susceptibles a las enfermedades fungosas y existen aproximadamente 700 especies de hongos entomopatógenos, y alrededor de 100 géneros.

Dentro de los más importantes se mencionan: *Metarhizium spp*, *Beauveria spp*, *Aschersonia spp*, *Entomophthora spp*, *Zoophthora spp*, *Erynia spp*, *Eryniopsis spp*, *Akanthomyces spp*, *Fusarium spp*, *Hirsutella spp*, *Hymenostilbe spp*, *Paecilomyces spp* y *Verticillium spp*, pertenecientes a la clase *Zygomycetes* e *Hyphomycetes* (López, Hans Börjes, 2001, citado por et.al. Delgadillo.O).

4.3. Hongo *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae (Metsch Sorokin) es el agente causal de la Muscardina verde y es un patógeno de más de 300 especies de siete órdenes de insectos. Los coleópteros son los hospederos más comunes. Es el segundo hongo Entomopatógeno más usado en el control microbial y es el hongo más utilizado en Latinoamérica. (Carballo, M, 2004)

4.3.1. Características

Visto al microscopio *M. anisopliae* presenta células conidiogénicas (filiadas) de forma cilíndrica, con ápices redondeados o cónicos y están arreglados en densos himenios. Los conidióforos son ramificados repetidamente formando una estructura semejante a un candelabro. Los conidios son aceptados, cilíndricos u ovoides formando cadenas

usualmente arregladas en columnas prismáticas o cilíndricas o en masas solidas de cadenas paralelas. Su color varía entre verde pálido brillante o brillante a verde amarillo. Los cadáveres de los insectos afectados, se observan completamente cubiertos con hongo color blanco. Cuando el Hongo esporula sobre el cadáver adquiere una coloración verdosa. (Carballo, M, 2004)

4.4. Taxonomía

Reino: Mycetae.

División: Amastigomicotina.

Sub División: Deuteromycotina.

Clase: Deuteromycetes.

Sub Clase: Hypomycetes.

Orden: Moniliales.

Familia: Moniliacea.

Género: *Metarhizium*.

Especie: *anisopliae*

(Alexopoulos y mims, 1979; McCoy et al, 1988; Samson, 1988, citado por gallegos et al, 2003)

4.4.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Metarhizium anisopliae* comprende una fase patogénica que se inicia con la unión de los conidias del hongo a las partes frágiles de la cutícula del insecto. Si las condiciones de humedad son adecuadas, ocurre la germinación de las conidias originando un tubo germinativo y luego se forma la estaquilla de penetración para entrar en la cutícula. Antes de que ocurra la muerte del insecto proliferan cuerpos hifales.

La muerte del insecto marca el fin de la fase patogénica y el micelio empieza a crecer saprofitamente dentro del hemocele invadiendo todos los tejidos. La muerte del hospedante ocurre tanto por el efecto mecánico del hongo como por el efecto de los metabolitos tóxicos producidos. Después de la muerte, ocurre una fase de crecimiento

micelio hacia el exterior que concluye con la producción de nuevas unidades reproductivas (conidias) sobre la superficie y rodeando el cadáver del insecto (Carballo, M, 2004).

4.4.2. Patogenicidad y Virulencia

Patogenicidad es la capacidad de un organismo en provocar una enfermedad. Es un atributo cualitativo, es decir un microorganismo puede o no ser patogénico. (Carballo, M, 2004).

La Virulencia se refiere a la intensidad o grado de las enfermedades este es permanente, relativo y debe ser comparado con otras cepas del mismo hospedero. (Carballo, M, 2004).

4.4.3. Modo de Acción

Los hongos Entomopatógenos actúan por contacto, además de la acción física del micelio producida por la multiplicación del hongo en el interior del cuerpo del insecto que invade los órganos y tejidos, es muy importante la participación de las destruxinas que tienen una acción insecticida propia. El hospedero produce reacciones de defensa celular por ejemplo granulomas que son tejidos formados para rodear el micelio. Las toxinas producidas por el hongo erosionan estos granulomas y permiten a las blastosporas invadir el hemocele. Las toxinas también matan al hospedero al provocar una degradación progresiva de sus tejidos debido a la pérdida de integridad estructural de las membranas y la consecuente deshidratación de la célula por pérdida de fluidos. (Carballo, M, 2004).

4.4.3.1. Germinación de las Conidias

Una excelente germinación ocurre en 12 horas con temperaturas de 23-30 °C y una humedad relativa de 80 %, Requiriendo de fuentes de Nitrógeno, carbono, y energía para la formación del tubo germinativo. La habilidad del hongo para utilizar estos elementos está en función de su Agresividad, virulencia, cantidad de conidias (requerida para matarlos) tiempo de germinación y penetración después de la adhesión de la cutícula del hospedero (Clark, 1986 y Smith y Grula, legar 1981 citado por Rosas 2000)

4.4.3.2. Formación de Apresorio

En la extremidad del tubo germinativo ocurre una dilatación de hifas formando una estructura.

4.4.3.3. Penetración

El crecimiento oficial de los hongos entomopatógenos, previos a la penetración de la cutícula es variable, generalmente ocurre en 24 horas, la naturaleza del estímulo o estímulos que causan la orientación del tubo germinativo de las conidias através de la cutícula, indican alguna forma de reconocimiento químico como pre requisito para la penetración. La penetración está dividida en dos procesos:

Físico: es cuando las hifas rompen áreas membranosas o esclerosadas.

Químico: es cuando el hongo produce enzimas como las proteasas, lipasas y quitinasas que facilitan la penetración mecánica.

4.4.3.4. Colonización

Después de la penetración inicia un proceso de colonización del hospedero, en ese momento se forman pequeñas colonias hifales que se van engrosando y ramificando en todo el cuerpo del huésped. El tiempo de colonización varía entre 76 y 120 horas dependiendo del insecto, patógeno y condiciones Ambientales.

4.4.3.5. Reproducción del patógeno

Después de 4 a 5 días que el insecto ha muerto emergen las hifas, espiráculos y regiones intersegmentales luego de 24 a 48 horas las hifas inician la formación de conidias, lo que se logra dependiendo del patógeno, radiación ultravioleta, temperatura y humedad.

4.4.3.6. Toxinas

Metarhizium anisopliae produce varias toxinas entre las cuales están los ciclodepsipeptidos como las dextruxinas A, B, C, D y la desmetildextruxina B y otras como la A1, A2, B1, C2, D1, D2, y E1. Son compuestos tóxicos para los insectos. (Carballo, M, 2004).

4.4.3.7. Modo de Entrada

Además de la acción física del micelio producida por la multiplicación del hongo en el interior del cuerpo del insecto que invade los órganos y tejidos, es muy importante la participación de las dextruxinas que tienen acción insecticida propia. El hospedero produce reacción de defensa celular por ejemplo granulomas que son tejidos formados para rodear el micelio. Las toxinas también matan al hospedero al provocar una degradación progresiva en sus tejidos debido a la pérdida de integridad estructural de las membranas y la consecuente deshidratación de las células por pérdida de fluidos.

4.4.4. Sintomatología

En los insectos enfermos se ven cambios de conducta como cese de alimentación, pérdida de coordinación, movilización, después de morir permanecen como cadáveres con los signos característicos como el crecimiento del hongo en las zonas intersegmentales del insecto y coloración verde por la esporulación del hongo.

4.4.5. Toxicidad

Este hongo no tiene efecto sobre la salud humana y otros organismos ni se han encontrado efectos negativos sobre las Abejas del campo (Carballo, M, 2004).

4.4.6. Ventajas de los hongos entomopatógenos

Los hongos Entomopatógenos son organismos con alto grado de aceptación Ecológica, por muchas razones entre ellas:

Control permanente: los hongos entomopatógenos logran introducirse y colonizar los Agroecosistemas y mantener su población.

Son específicos a nivel de familia, esto hace posible que los entomopatógenos puedan ser integrados al MIP.

Rentabilidad: los insumos biológicos son baratos al igual que su manejo, lo que representa un ahorro considerable en los costos de producción. (Leoucona.R.1995)

4.4.7. Hongos en el control de insectos

Metarhizium anisopliae y *Beauveria bassiana*. El primer trabajo de control microbiano fue realizado por Metschnikoff en 1879. Siguiendo estas legaciones en 1884 fueron producidos 55 kg. Del hongo *M. anisopliae*, para el control de larvas del curculiónido *Cleonus punctiventris*, Germen, con el cual se obtuvo un control de 55 a 80% de insectos en pequeñas áreas, después de 10 a 15 días de la aplicación (Martignoni 1968). Según (Alves, S, B, 1986), ese patógeno ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de los diferentes órdenes incluyendo plagas importantes (Carballo, M, 2004).

4.4.8. Impacto ambiental de hongos entomopatógenos

El uso de hongos no causa perjuicios en los seres humanos y animales por su grado de especificidad, y en aspecto importante contribuye a la sostenibilidad Ecológica.

Algunos hongos entomopatógenos son bastante específicos, diversos estudios sobre efectos secundarios han indicado que no se pone en riesgo a organismos acuáticos, poco o ningún impacto sobre artrópodos terrestres y no afectan vertebrados o animales de sangre caliente (aunque se recomienda usar el equipo de protección adecuado y no inhalar las esporas).

La FAO en el año 2003 recomienda el uso de mico insecticidas en áreas ambientales sensibles aunque los trabajos de investigación realizados hasta la fecha indican bajos o no impacto ambiental de hongos entomopatógenos, es necesario estudiar con precisión el efecto de los mico insecticidas disponibles sobre insectos que no son plagas que coexisten con especies plagas, a las que se dirige el control (Barrientos, 2002 citado por et.al. Delgadillo.O).

Los ectoparásitos son organismos que viven y dependen de un huésped y estos provocan enfermedades ya que pueden ser vectores de virus, por eso es importante el conocimiento, manejo y control de estos

4.4.9. Taxonomía de la Garrapata

Reino: Animal

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Chelicerata

Clase: Arachnida

Orden: Acarina

Grupo: Parasitiformes

Suborden: Ixodoidea

Familia: Ixodidae

Género: *Boophilus*

Especie: *microplus*

(Ozamiz JM, Uribe LF Londres, 1970).

4.5.0. Ciclo de vida de las garrapatas. (*Boophilus microplus* spp)

Las larvas emergen de los huevos que emergen de la tierra. Siete a diez días más tardes estas suben a la vegetación en busca de un huésped.

Las larvas se fijan al huésped y engordan a expensas de su sangre, luego entran en estado de muda, dos días más tardes las ninfas emergen de la muda y también se alimentan a base de sangre por espacio de cinco a seis días.

Las ninfas repletas entran en estado de muda, el cual dura dos días y del cual emergen adultos, machos y hembras. La fertilización se lleva a cabo y luego la hembra realiza una abundante ingestión de sangre.

La hembra repleta cae al suelo veinte o más días después de haberse fijado como larva y busca un lugar adecuado para poner sus huevos. Cada hembra pone 2.000 huevos en un rincón húmedo en el suelo (Ozamiz JM, Uribe LF, 1970).

4.5.1. Trasmisión de enfermedades entre la garrapata y su huésped bovino

Por regla general, las larvas de garrapatas no son trasmisoras de enfermedades al emerger de los huevos, ya que todavía no se han alimentado de un huésped infectado (las excepciones a esta regla son las larvas de *Boophilus*). Si las larvas recién incubadas se alimentan de huésped infectado, pueden ingerir algunos organismos de la enfermedad al alimentarse con su sangre. Una vez ya ninfas, pueden pasar, a su vez, estos organismos a otro huésped del cual se alimenten, y transmitir la enfermedad, siempre y cuando dicho huésped sea susceptible a la enfermedad. De modo parecido, la garrapata puede adquirir la enfermedad durante su comida de ninfa y pasarla al huésped durante su comida de adulto. Los organismos de la enfermedad generalmente son introducidos en el huésped con la saliva de la garrapata durante su comida.

4.5.2. Periodo de incubación

Una garrapata portadora que se alimente de un huésped susceptible, no producirá inmediatamente la enfermedad, ya que el huésped no presentara síntomas de la enfermedad hasta que los organismos transmitidos por la garrapata hayan tenido tiempo de multiplicarse en el sistema circulatorio y otros tejidos del huésped.

El tiempo que transcurre entre la transmisión de los organismos por la garrapata y la aparición de los síntomas de la enfermedad en el huésped se llama periodo de incubación.

4.5.3. Susceptibilidad del ganado vacuno a la infestación y a la enfermedad

Los propietarios de ganado con su experiencia en lo que a garrapata se refiere, saben que algunos animales están generalmente más abundantemente infestados que otros, y se supone que esta diferencia es que unos animales tienen una mayor inmunidad natural que otros.

Esta diferencia es mayor cuando se hace una comparación entre animales nativos que se han criado en un medio ambiente infestado de garrapatas y animales importados que se encuentran por primera vez con la amenaza de las mismas. También se puede ver una diferencia en la susceptibilidad de los animales a las enfermedades transmitidas por las garrapatas. Los animales nativos tienden a sobrevivir los ataques de las enfermedades mejor que los importados (Ozamiz JM, Uribe LF, 1970).

4.5.4. Daños al animal infestado por garrapata

Caída en el rendimiento de los animales, anemias, dolor, picazón en el lugar de fijación de la garrapata, puede ocasionar trastornos auditivos. Infecciones secundarias por bacterias y miasis.

Algunas especies de garrapatas pueden ocasionar parálisis por el componente metabolitos tóxicos en la saliva.

La extracción de sangre de una garrapata hembra puede ser de 2 ml por cada succión.

Actúan como vectores de enfermedades parasitarias y bacterianas.

(Unan Leon, CRM, TechnoServe, Leon, julio 2010).

4.5.5. Estudios realizados

En el año 2007 en el país de Costa Rica se ejecutó un trabajo que describiría el estudio y análisis del Control Biológico de la Garrapata (*Boophilus microplus*) con el hongo *Metarhizium anisopliae*.

La garrapata es un ectoparásito de un solo hospedero, perteneciente a la clase arácnida. Presenta cuatro estadios (huevo, larva, ninfa y adulto) Esta plaga pertenece a la familia Ixodidae y al género de las garrapatas duras, cuyo tegumento es esclerotizado, además tiene la cabeza y el tórax fusionados, lo que los diferencia de la Clase Insecta. Se ha demostrado que esta plaga se puede controlar con *Metarhizium anisopliae* este es un controlador biológico un hongo Entomopatógeno- el cual produce una alteración en la fase no parasítica y penetra al insecto por contacto. El *Metarhizium* es el hongo entomopatógeno más utilizado en el control microbial y es capaz de parasitar las teleóginas de *B. microplus*. El hongo presenta tres fases principalmente: La fase patogénica, que es donde el hongo penetra por las partes frágiles del insecto y parasita, donde produce una presión mecánica y efecto bioquímico con las toxinas que produce. La segunda fase produce geminación de conidios donde se produce el tubo germinativo y la estaquilla de penetración y proliferan los cuerpos hifales antes de la muerte del insecto. Y en la tercera fase ocurre la muerte del ácaro que da fin a la fase patogénica, penetración de los tejidos y crecimiento micelial al exterior, donde se producen conidia en la superficie del insecto. Para el experimento de prepararon las matrices de *Metarhizium anisopliae*, se prepararon bolsas con inóculo a partir de esta y a partir de las conidias se elaboró la dilución para asperjar en las pruebas *in vivo* e *in vitro*. Se observó que las condiciones ideales para la acción del hongo es de aproximadamente 1×10^9 conidias/ ml, a 27-28° C con humedad y luz controlada. (Arce, F, 2007)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en dos etapas, una en el laboratorio de hongos Entomopatógenos en las instalaciones del Campo Agropecuario y una de campo la que se realizó en la finca Las Mercedes propiedad del Señor Alfredo Gonzales, en el municipio de Malpaisillo – León la cual se caracteriza por tener las siguientes condiciones meteorológicas, Temperatura promedio de 31° C, humedad relativa de un 75% y precipitaciones anuales promedio de 1720 mm.

5.1. Variables a medir:

Etapa I Laboratorio

- Mortalidad: se midió contando el número de garrapatas muertas después de infestadas de *Metarhizium anisopliae* (Metsch Sorokin) cepa (Metagreen).
- Esporulación: se evaluó a los 10 días determinando la presencia del hongo y la cantidad de garrapatas infectadas con los hongos.

Etapa II Campo

Niveles de infección: Alto, medio, leve. Estos se tomaron antes y después de cada aplicación de hongo realizada en los bovinos.

Mortalidad: la mortalidad se midió contando el número de garrapatas muertas después de las aplicaciones de metarhizium.

Esporulación: Se midió a los 10 días determinando la presencia del hongo en las garrapatas recolectadas después de las aplicaciones de metarhizium.

5.1. Colección de insectos

La recolección de ninfas de garrapatas (*B. microplus*) de ganado bovino se realizó en la finca Las Mercedes, carretera León, Malpaisillo, extrayéndolas manualmente, se

colocaron en tazas plásticas con tapaderas para trasladarlas al laboratorio de hongos Entomopatógenos en el campo agropecuario esto fue para la etapa de laboratorio.

Para la colecta de garrapatas en etapa de campo se realizó a los 2 días después de cada aplicación marcando cada animal por un total de 30 animales con pintura aerosol color rojo.

5.2. Conteo de conidias

El conteo de conidias consiste en tomar muestras del hongo para esto se diluyó 1 gramo de hongo en 80 ml de agua se mezcló hasta obtener una solución homogénea.

Se preparó la cámara de Neubauer, se colocó una gota de la dilución y utilizando el microscopio se realizó el conteo de conidias. Esta cámara tiene una serie de cuadrantes pequeños que tienen un factor de 4×10^6 , se contaron 5 puntos de la cámara, los extremos y centro para un total de 25 cuadros.

La formula usada es:

$$x = 25 \times 4 \times 10^6 \times \text{volumen de dilución.}$$

Donde X: promedio de conidias en 3 repeticiones

4×10^6 : factor de cuadrantes pequeños (diámetro / profundidad / volumen)

25: numero de cuadrantes.

5.3. Prueba de patogenicidad

Para evaluar la patogenicidad del bioensayo se realizó por la técnica de inmersión de los insectos en el primer bioensayo, en los dos bioensayos restantes se uso un gotero para aplicar a cada insecto dos gotas.

Las evaluaciones se realizaron cada dos días, hasta que murió el último insecto. La mortalidad se midió en porcentaje.

$$X = \frac{\# \text{ de garrapatas muertas}}{\# \text{ Total de garrapatas empleadas en el bioensayo}} \times 100$$

5.4. Prueba de Viabilidad

La prueba de viabilidad se realizó tomando una muestra de la solución de hongo que se utilizó en el conteo de Conidias. Se colocaron 5 gotas en el medio de cultivo de papa, dextrosa y agar (PDA), se evaluó la germinación y esporulación de *Metarhizium anisopliae* a las 24 horas y luego con ayuda de un microscopio con el lente número 100X se contaron las conidias germinadas, las no germinadas y el total de Conidias. Las condiciones de laboratorio de hongos entomopatógenos consta con una temperatura que oscila de 25 a 27 °C y una humedad relativa de 80%.

El porcentaje de Viabilidad se determina:

% de viabilidad: $\text{conidias germinadas} \div \text{total de conidias} \times 100$

5.5. Montaje del bioensayo

La solución se preparó en un Erlenmeyer con 100 ml de agua, con 2 gr de hongos (conidias), se agitó. Ya preparada la solución en un plato petri con papel toalla, se sumergieron las ninfas por 3 segundos en la solución y se colocaron en un plato petri. Se utilizaron 10 ninfas por repetición para un total de 90 ninfas en los 3 bioensayos. La concentración de conidias fue de 2×10^8 c / ml.

5.6. Medición de esporulación

Los insectos muertos se colocaron en cámara húmeda para lo que se utilizaron platos petri de plástico a los que se le colocaron papel toalla, en ellos se colocaron los insectos y se les agregaron 2 a 3 gotas de agua esterilizada, se taparon, sellaron, y se ubicaron en un sitio del laboratorio a temperatura de 25 a 27 °C.

La revisión se hizo 3 veces por semana.

5.7. PRODUCCION DE HONGO

El hongo *Metarhizium anisopliae* cepa metagreen fue adquirido en la Universidad Nacional Agraria (UNA).

5.7.1. Preparación de extracto de malta.

Se agrego a un Erlenmeyer un litro de agua con 3 gr de extracto de malta, se agitó hasta homogenizar la solución, se sello con papel aluminio y maskintape, se puso a esterilizar a 121⁰ Centígrados, 15 libras de presión por 20 minutos.

5.7.2. Preparación de suspensión fungosa

Se utilizo la extracto de malta se agrego a este, 3 gramos de arroz con el hongo, se agito 'para obtener una suspensión homogénea, mezclados con la ayuda de una espátula

5.7.3. Elaboración de bolsas

Se lavaron 2 libras de arroz, se pre coció en agua, hirviendo por 15 minutos, posteriormente se deajo enfriar en un papelógrafo. Una vez listo se procedió al llenado de las bolsas colocando 300 gramos de arroz en cada una de las bolsas de polipapel, se puso a esterilizar las 10 bolsas de arroz junto al equipo para inocular (embudo para filtrar, 2 Erlenmeyer adicionales, extracto de malta) al transcurrir los 15 minutos en el autoclave se pusieron a enfriar y luego se colocaron en el refrigerador.

5.7.4. Inoculación de las bolsas

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

- Se desinfecto el equipo y se encendió la cámara de transferencia.
- Se colocó el mechero encendido sobre la cámara y los materiales a usar.
- Desinfección de las manos con alcohol.
- Una vez esterilizado todo el equipo para inocular, se introdujo la jeringa en la solución fungosa.
- Se dibujo un circulo en las bolsas y se depositaron 20 ml de solución en cada una de las bolsas, bien distribuidas.
- Sellamos y agitamos las bolsas.
- Al retirar las bolsas de la cámara, se colocaron en un lugar limpio en el laboratorio a temperatura de 18⁰ Centígrados.

5.7.5. Control de calidad

Al transcurrir 24 horas el hongo germinó y se obtuvo realizo el conteo de conidias germinadas y no germinadas identificando contaminantes y otros hongos no deseados y a los 7 días después de inoculadas las bolsas.

Etapa de campo

Aplicación: Las aplicaciones se realizaron con bombas manuales de 20 litros utilizando como dosis por bomba dos bolsas de producto de *Metarhizium anisopliae* (*Metsch Sorokin*) *cepa* (metagreen) asperjando aproximadamente.

Se trabajo con 30 animales estos fueron completamente asperjados hasta penetrar el pelo del animal. Se realizaron dos aplicaciones cada siete días y otra a los nueve días con el hongo *Metarhizium anisopliae* (*Metsch Sorokin*) *cepa* (metagreen).

Al pasar 3 días después de cada aplicación se tomaron 150 garrapatas infestadas de muestras en total para llevarlas al laboratorio y evaluar la Mortalidad y Esporulación.

5.7.6. Resultados de conteo de conidias

Fórmula utilizada:

$X * 25 * 4 * X 10^6 * \text{volumen de la dilución.}$

$12.5 * 80 * 25 * 100000 = 2500000000 = 2 \times 10^8$ Conidias por milímetro.

5.7.7. Prueba de viabilidad

La fórmula utilizada fue:

$X = 100 * \text{Conidias germinadas} / \text{total de Conidias.}$

$X = 100 * 636 / 658 = 96.65 \%$.

Porcentaje de esporulación

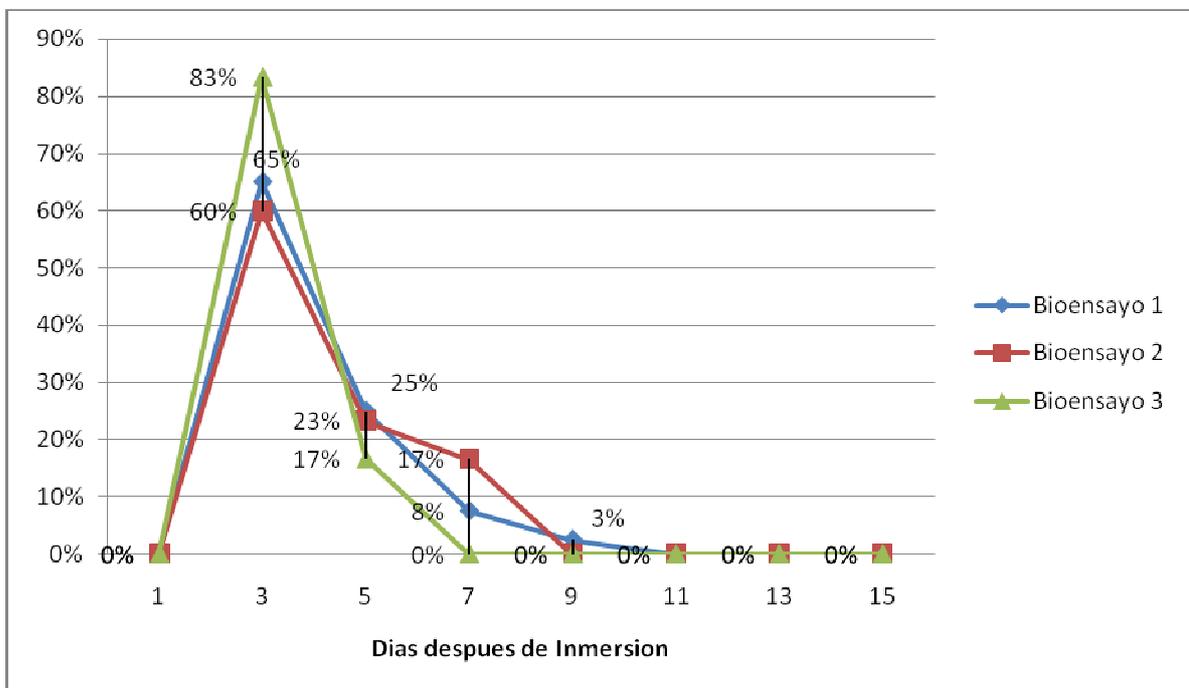
La fórmula utiliza fue:

$$X = \frac{\text{Número total de garrapatas esporuladas}}{\text{Número total de garrapatas muertas}} \times 100$$

VI. Resultados y Discusión

El porcentaje de mortalidad de ninfas de garrapatas infestadas por *Metarhizium* obtenida en el laboratorio, se observó al día 3 después de infestadas, en el bioensayo 1 el porcentaje de mortalidad fue de 65 %, bioensayo 2 con el 60% , el mayor porcentaje de mortalidad en el bioensayo 3 con el 83% de ninfas muertas y en los días siguientes se mantiene constante la mortalidad hasta el día 9, demostrando así que el hongo *Metarhizium anisopliae* (Metsch Sorokin) cepa (metagreen) actúan en las ninfas de garrapatas en los primeros 9 días después de infestadas. Nuestro resultado coincide con el obtenido en un estudio realizado en 2007 por O. Delgadillo que consistía en la evaluación de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Boophilus microplus* los resultados de mortalidad iniciaron a los 3 días después de la inmersión en el hongo. Ver grafico 1

Grafico N^o. 1

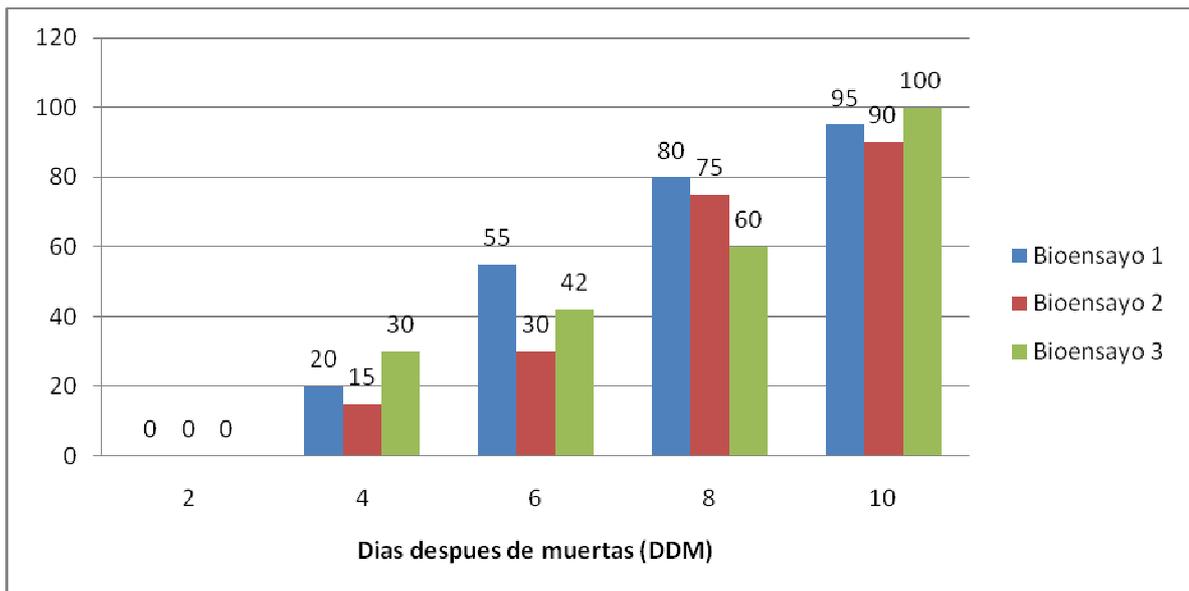


Porcentaje de Mortalidad de garrapatas (*Boophilus microplus*) a causa de *Metarhizium anisopliae* en condiciones de Laboratorio

La esporulación obtenida en laboratorio después que las ninfas de garrapatas (*Boophilus microplus*) murieron, se desarrollo conforme al paso del tiempo, observandose que los bioensayos 1 y 2 alcanzan un 90% de esporulación y el mayor porcentaje de esporulación se presenta en el bioensayo 3 con un 100%. observandose el mayor porcentaje de esporulación del hongo lo que demostró que la esporulación es mayor a los 10 dias después de muertas las ninfas.

Sabemos que la esporulación de estos insectos es evidencia de la mortalidad del agente causal y se puede ver afectada por la temperatura y humedad. Esto ocurrió en el trabajo realizado en 2007 O. Delgadillo que consistía en la evaluación de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Boophilus microplus*, en el cual los porcentajes de esporulación fueron menores de 40 % debido a las condiciones de ambiente. ver grafico N° 2.

Grafica N° 2.



Porcentaje de Esporulación del hongo *Metarhizium anisopliae* sobre garrapatas (*Boophilus microplus*) en Bioensayos

La evaluación de los niveles de infección de garrapatas antes y después de cada una de las aplicaciones se realizaron en campo, en la repetición 1 antes de la aplicación se presentaba un nivel de infección del 60% (medio) después de la aplicación se dió un nivel de infección del 30% (leve), lo que refleja la disminución de la población de garrapatas (*Boophilus microplus*) a causa de la aplicación del hongo *Metarhizium anisopliae*. En la repetición 2 y 3 se mantiene constante el nivel de infección esto a causa de las condiciones climáticas ya que es una zona seca y el invierno inicio tarde, aun así es notorio la disminución del nivel de infección de este organismo.

En el trabajo realizado por O. Delgadillo et. Al. en 2007 mostró que después de la primera aplicación el nivel de infección que se obtuvo fue leve de 30%. Ver cuadro 1

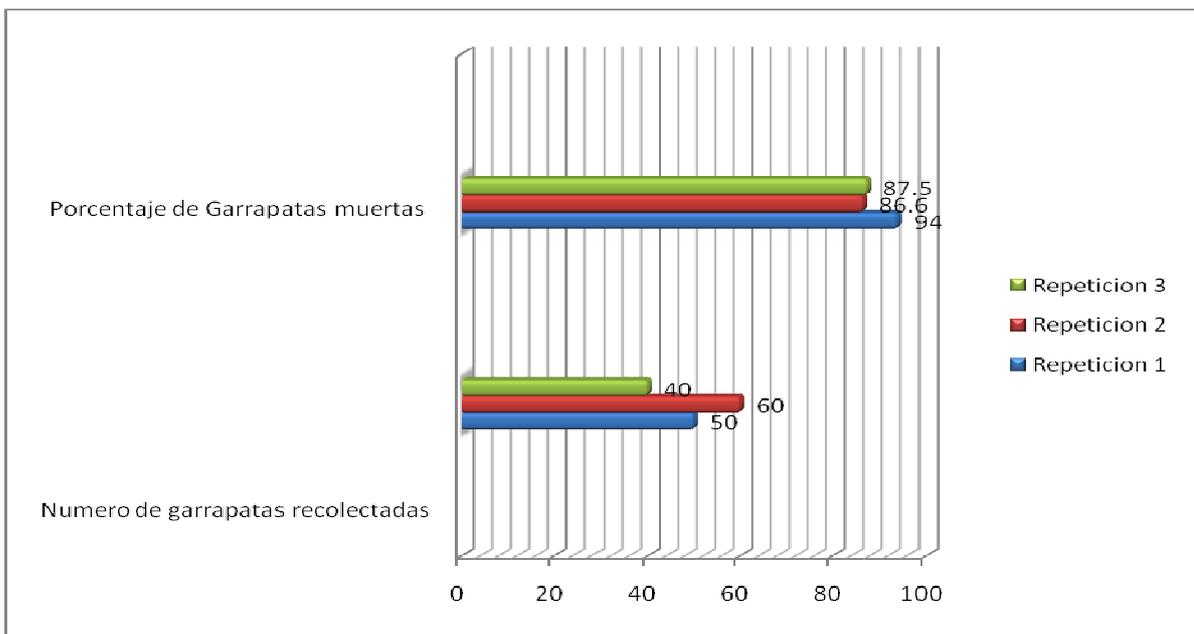
Cuadro N°. 1

Cuadro comparativo del nivel de infección de garrapatas del ganado		
	Antes	Después
Repetición 1	60%	30%
Repetición 2	30%	30%
Repetición 3	30%	60%

La Evaluación de la mortalidad de garrapatas (*Boophilus microplus*) en la etapa de campo, se llevó a cabo en la Finca las Mercedes en el Municipio de Malpaisillo. Después de cada aplicación del hongo se recolectaban garrapatas (*Boophilus microplus*) , en la repetición 1 se colectaron 50 garrapatas de estas el 94% murieron a causa de *Metarhizium anisopliae*, en la repetición 2 se colectaron 60 de las cuales el 86.6 % y en la repetición 3 se colectan 40 garrapata (*Boophilus microplus*) de ellas murieron el 87.5% a causa y con síntomas de infección del hongo. Esto muestra que *Metarhizium* es efectivo para el control de garrapatas (*Boophilus microplus*) en ganado bovino.

En un trabajo realizado en Costa Rica por Arce F, y Palma M . el cual consistía en la evaluación Control Biológico de la Garrapata (*Boophilus microplus*) con el hongo *Metarhizium anisopliae*, de 120 garrapatas que se encontraron en el conteo, a los 19 días de infestadas con el hongo la disminución de esta población de garrapatas fue de 26.6 %. Ver grafica 3

Grafica N° 3.

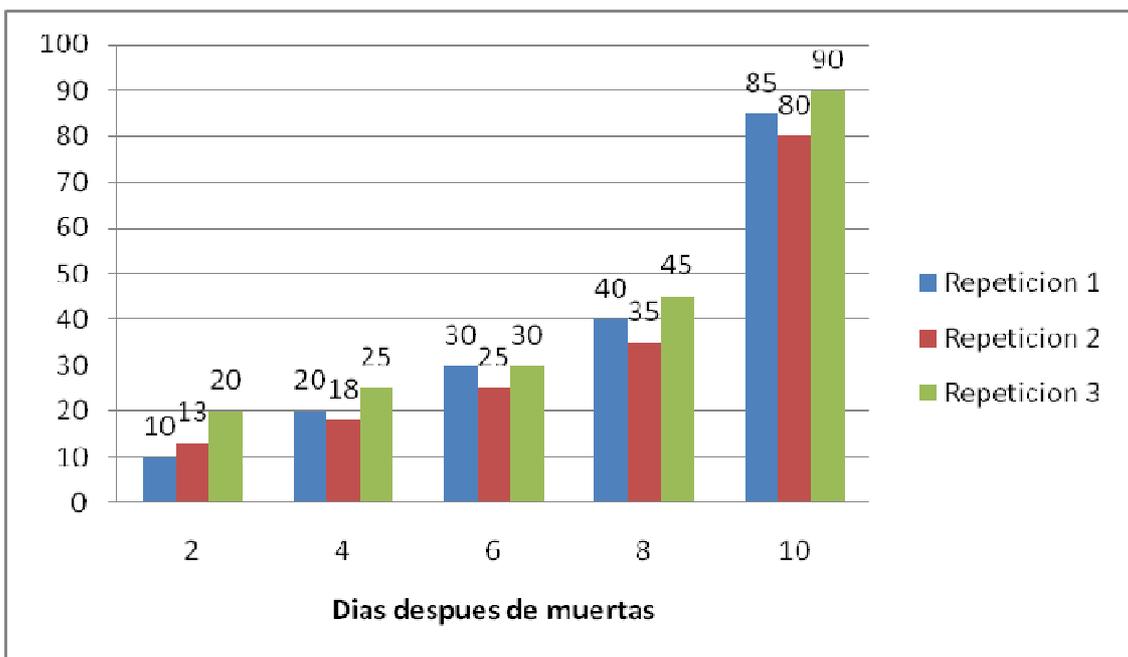


Porcentaje de Mortalidad de garrapatas (*Boophilus microplus*) infectadas por *Metarhizium anisopliae* en Campo

En cuanto al porcentaje de esporulación obtenido en la etapa de campo en la finca las Mercedes, la repetición 1 con 85 %, la repetición 2 presentó un 80 % y el mayor % esporulación se obtuvo en la repetición 3 con un 90%, y esto a los 10 días después de muertas las ninfas de garrapatas (*Boophilus microplus*). Lo que confirma la patogenicidad y esporulación del hongo *Metarhizium anisopliae* en ninfas de garrapatas (*Boophilus microplus*).

Al realizar las aplicaciones, las condiciones climáticas no fueron las adecuadas según la literatura, ya que el hongo se desarrolla totalmente en condiciones húmedas, y en la zona en la que se llevó a cabo el trabajo presenta clima tropical seco. Las 2 aplicaciones anteriores se realizaron en época que el invierno aun no iniciaba totalmente en cambio la tercera aplicación se realizó 1 día antes que se presentara un temporal de 10 días de lluvias constantes. Ver grafica 4

Grafica N° 4.



Porcentaje de esporulación de *Metarhizium anisopliae* en garrapatas *Boophilus microplus* en etapa de campo.

VII. CONCLUSIONES

La cepa (Metagreen) de *Metarhizium anisopliae* (Metsch Sorokin) es patogénica a las ninfas de garrapatas *Boophilus Microplus*, causando mortalidad en laboratorio de 83% a los 3 días después de la inmersión de ninfas en la suspensión del hongo. En la etapa de campo la mortalidad fue de 94%, estas murieron a los 5 días después de realizada la aplicación del hongo a las vacas.

La cepa Metagreen de *Metarhizium anisopliae* (Metsch Sorokin) evaluado en laboratorio presentó un 100% de esporulación en las garrapatas a los 10 días después de muertas, en la etapa de campo la esporulación fue de 90% a los 10 días después de muertas.

De esta manera se comprobó que las ninfas de garrapatas *Boophilus microplus* son susceptibles a *Metarhizium anisopliae* (Metsch Sorokin) cepa Metagreen, demostrando así el control biológico que ejerce este hongo Entomopatógeno.

VIII. Recomendaciones

Realizar las aplicaciones en época húmeda para obtener mayores efectos del hongo entomopatógenos.

Las aplicaciones llevarlas a cabo en horas de la tarde para mayores resultados ya que el hongo requiere condiciones de humedad para desarrollarse y ejercer mayor efecto.

Al ejecutar trabajos futuros de evaluación de hongos entomopatógenos se debe aumentar la concentración de conidias del producto biológico para mayor eficacia del mismo ya que la concentración del hongo fue de 10^8 y así tener mayor concentración de conidias.

Trabajar con mas animales, esto por la efectividad del trabajo y así los datos sean más representativos.

Evaluar el comportamiento del Hongo en ambas estaciones: Invierno, Verano.

Hacer aplicaciones de hongo al pasto por donde pastorea el ganado.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Alves S.B. 1986, Control microbiano de insectos. Editora Manole LTDA.
- Arce, F., Palma, M. 2007. Control Biológico de la Garrapata (*Boophilus microplus*) con el hongo *Metarhizium anisopliae*. tesis. Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica.33 pág.
- Barahona. J. E. Campos. I. V – Evaluación de la Patogenicidad y Esporulación (cepa Bisa -01 – Metharisa) de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin en tres concentraciones 10^{10} , 10^9 , 10^8 , sobre ninfas de Salivitas (*Aenolamia* sp) en el laboratorio de Hongos Entomopatógenos del campo Agropecuario. Tesis. Unan- León. 2008
- Control Biológico de Plagas Agrícolas/ Manuel Carballo.[et al – ed. Managua. CATIE, 2004.232 p (serie técnica. Manual técnico/CATIE; N° 53).
- Control de garrapatas de ganado vacuno traducido a castellano por JM Ozamiz, LF Uribe Londres, 1970. publicación Couper London: martins. 65 p.
- Delgadillo romero M.O. Gómez Ramírez, M.A. Jiménez Lagos, C.A. 2007.Evaluacion del hongo Entomopatógeno *Beauveria bassiana* para la regulación de la población de garrapata *Boophilus microplus* del ganado bovino en la hacienda la Esperanza. Tesis Ing. Agroecología Tropical. León, Nicaragua, UNAN- León. 40 pag.
- Gallegos. G. 2003, entomopátogenos. Editorial Trillas S. A. de México.
- Leoucona.R.1995, Microorganismos patógenos en el control microbiano de insectos plagas. Pág. 33

- Proyecto Occidente ganadero, Manual de parásitos mas comunes en Bovinos del occidente de Nicaragua, Unan León, CRM, TechnoServe, León, julio, 2010.
- Rosas J. Hongo Entomopatógenos. Curso internacional de patología de insecto, Ciudad de Victoria, Tamaulipas, 2000.
- Taller de Reproducción y uso de Hongos Entomopatógenos, versión preliminar, Managua 2000. Proyecto de opciones de manejo de plagas Insectiles con énfasis en el uso de hongos entomopatógenos. (UNA, Catie /INTA, FAITAN), 49 pág.

Anexos

Anexo 1



Figura 1. Recolección de garrapatas (*Boophilus microplus*) en la finca Las Mercedes



Figura 2. Inmersión directa de *M. anisopliae* a garrapatas (*Boophilus microplus*)

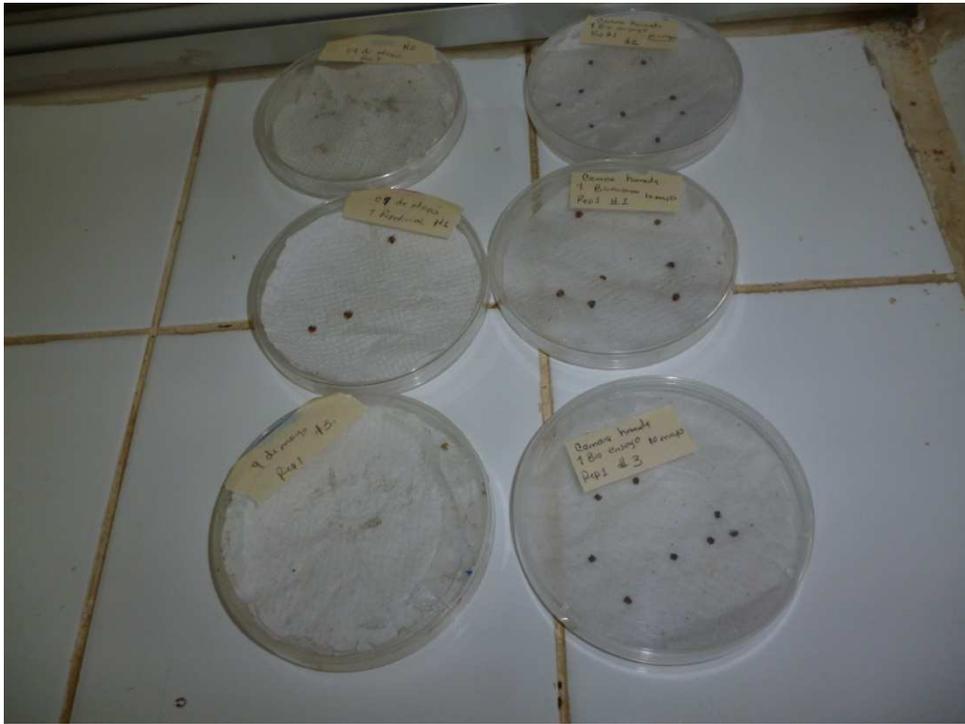


Figura.3 Montaje Bioensayos

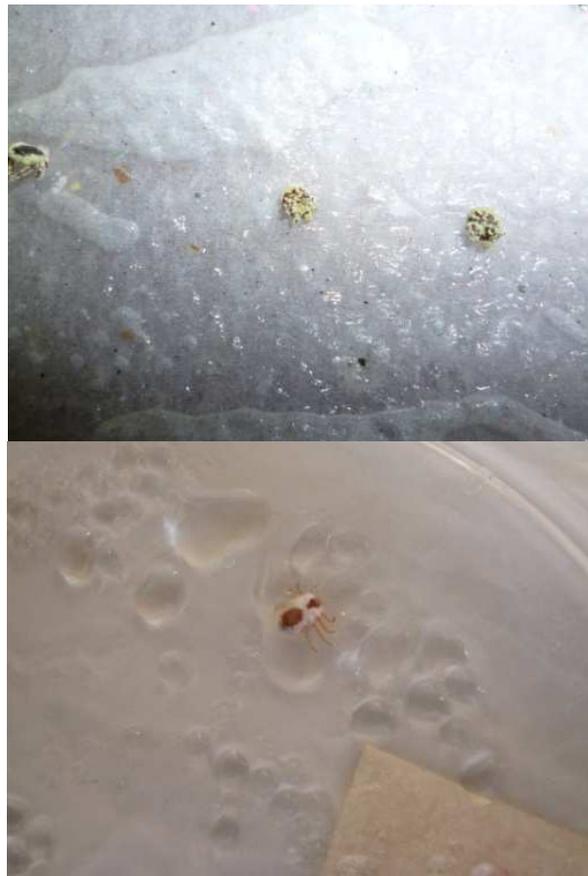


Figura.4 Garrapatas (*Boophilus microplus*) infectadas y esporuladas por *Metarhizium anisopliae*.



Figura.5 Esporulaci3n del hongo *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus*



Figura.6 Bomba de mochila y hongo *M. anisopliae* disuelto en agua para aplicación en el ganado



Figura.7 Ganado infectado de *Boophilus microplus*



Figura.8 Aplicación directa al ganado de hongo *Metarhizium anisopliae*