

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA- León

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Agroecología



Evaluación del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para la regulación de las poblaciones de garrapatas (*Boophilus microplus*) del ganado bovino en la hacienda La Esperanza municipio Mina el Limón del Departamento de León en el período de abril del 2006 a agosto del 2007.

PREVIO A OPTAR AL TITULO DE INGENIERO EN AGROECOLOGIA TROPICAL

PRESENTADO POR:

- **Br. Octavio Manuel Delgadillo Romero.**
- **Br. Manuel Alejandro Gómez Ramírez.**
- **Br. Cristóbal Alexander Jiménez Lagos.**

Tutor: M.Sc. Henry Harold Doña.

Asesor: Lic. Marcia del Socorro Gómez

León, Noviembre 2007

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO.....	i
DEDICATORIA.....	ii
RESUMEN.....	V
INDICE DE GRAFICAS.....	Vi
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS	3
III. MARCO TEORICO.....	4
3.1.Ciclo de vida de la garrapata.....	5
3.1.1. Huevos.....	5
3.1.2. Larvas y ninfas.....	5
3.1.3. Los adultos.....	6
3.2. Ciclo de vida de la garrapata del ganado vacuno.....	6
3.3. Las garrapatas más comunes.....	6
3.4. Transmisión de enfermedades.....	7
3.4.1. Enfermedades conocidas en América Central.....	8
3.4.2. Identificación de garrapatas.....	8
3.4.3. Por que se deben destruir las garrapatas.....	9
3.4.4. El uso de productos químicos para control de garrapatas.....	9
3.4.5. Selección de garrapaticida.....	10
3.4.6. Resistencia a los ixodicidas.....	10
3.4.7. Resistencia de las garrapatas en todo el mundo.....	11
3.5. Control microbial.....	12
3.5.1. El hongo <i>Beauveria bassiana</i>	12
3.5.2. Morfología.....	12
3.5.3. Taxonomía.....	12
3.5.4. Patogenicidad y virulencia.....	13
3.5.5. Modo de acción de <i>Beauveria bassiana</i>	13
3.5.5.1. Germinación.....	13
3.5.5.2. Formación de apresorios.....	14
3.5.5.3. Penetración.....	14
3.5.5.4. Colonización.....	14
3.5.5.5. Reproducción del patógeno.....	14
3.5.6. Síntomas.....	15
3.5.7. Reproducción del hongo.....	15
3.5.8. Uso del hongo entomopatógeno en el control de plagas.....	18
3.6.0. Características o propiedades de un patógeno para ser efectivo como bioinsecticida.....	19
3.7.0. Ventaja de hongo entomopatogeno.....	20
3.8.0. Impacto ambiental de los hongos entomopatógenos.....	20
3.9.0. Uso actual y futuro de entomopatógenos	20

IV. MATERIALES Y METODOS.....	22
4. Colección de la garrapata.....	22
4.1. Producción de conidias.....	22
4.1.2. Elaboración de medio líquido.....	22
4.1.3. Siembra del hongo.....	23
4.1.4. Elaboración de bolsas	23
4.1.5. Inoculación de las bolsas.....	23
4.2 Control de calidad de la producción	23
4.2.1. Conteo de blastosporas.....	24
4.2.2. Medición de concentración de la suspensión fungosa.....	24
4.2.3. Prueba de viabilidad.....	24
4.3. Montaje del bioensayo.....	24
4.3.1. Prueba de patogenicidad.....	25
4.3.2. Medición de la esporulación.....	25
4.4. Estudio de campo.....	25
4.4.1. Descripción del trabajo de campo.....	26
4.4.2. Obtención de los porcentajes de infección y recuento.....	26
4.4.3. Baños de los animales.....	26
V. RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	27
5.1. Prueba de patogenicidad.....	27
5.2. Porcentajes de esporulación.....	29
5.3. Porcentaje de contaminación.....	31
5.4. Niveles de infección antes de la aplicación.....	32
5.5. Niveles de infección después de la primera aplicación.....	33
5.6. Niveles de infección después de la segunda aplicación.....	34
Niveles de infestación antes y después de la aplicación	35
VI. CONCLUSIONES	36
VII. RECOMENDACIONES.....	37
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	38

AGRADECIMINETO

A nuestro tutor M.Sc. Henry Doña, por su interés y ayuda a nuestro persona durante la realización de este trabajo.

A la Lic. Marcia Gómez por la ayuda incondicional en el desarrollo de nuestra tesis.

Al personal del laboratorio de Control Biológico de la UNAN- León por sus prestaciones y servicios, para realizar el presente trabajo.

Al Ing. Joel Castellón por permitir realizar nuestro trabajo en su finca la Esperanza.

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

**Octavio Manuel Delgadillo Romero
Manuel Alejandro Gómez Ramírez
Cristóbal Alexander Jiménez Lagos**

DEDICATORIA

A Dios por haberme dado la vida y permitido llegar a finalizar los estudios.

A mi madre Sra. Irlanda Romero Maradiaga por su amor, esfuerzos y comprensión y mi tío Javier Romero por su apoyo incondicional en todos mis años de estudio.

A mi profesor Msc. Henry Doña y Lic. Marcia Gomez por su apoyo, comprensión y haberme mostrado el camino a la superación.

Octavio Manuel Delgadillo Romero

DEDICATORIA

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

A mi madre Sra. Fany Ramírez Martines, por todo el apoyo económico y moral.

Al profesor Msc. Henry Doña y Lic Marcia Gómez, por haberme enseñado el camino correcto.

Manuel Alejandro Gómez Ramírez

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida y haberme permitido terminar con éxito una de mis primeras metas.

A mi madre Sra. Carmen Isabel Lagos García por inculcarme buenos valores y darme el apoyo económico y moral.

A mi profesor Msc. Henry Doña y Lic. Marcia Gómez por su apoyo incondicional hasta finalizar este trabajo.

A mis familiares y amigos que siempre me brindaron su confianza y apoyo.

Cristóbal Alexander Jiménez Lago

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la eficiencia de la cepa 114 de *Beauveria bassiana* en la regulación de la población de garrapatas (*Bophilus microplus*) del ganado bovino se realizó la presente investigación en la cual se determinó de la susceptibilidad de cada uno de los estadios de desarrollo de las garrapatas al hongo entomopatógenos. De igual manera se evaluó la calidad de producción de la cepa 114 reactivada en garrapata el trabajo se realizó en 2 etapas; la etapa 1 consistió en trabajo de laboratorio donde se utilizaron 150 ninfas y adultos de garrapata, extraídas directamente del ganado éstas se desinfectaron con agua y posteriormente se inocularon con la cepa 114 del hongo aislada de picudo de plátano (***Cosmopolites sordidus***) esto con el propósito de realizar prueba de patogenicidad haciendo uso de la técnica de inmersión realizando 3 bioensayos con 75 garrapatas evaluando cada tres días midiendo la mortalidad en términos de porcentajes. La mortalidad del primer bioensayo se presentó a los 9 días con un 74%, en el segundo bioensayo se presento mortalidad a los 7 días 94%, en el tercer bioensayo a los 7 días 94.6 % demostrando de esta manera que el hongo es patogénico para garrapatas. Posteriormente se realizó una prueba de viabilidad que consistió en colocar en un plato petri con PDA cinco gotas de la suspensión del hongo luego estos platos se colocaron en un incubador a una temperatura de 25-27 grados centígrados realizando lectura a las 24 horas esto para determinar la cantidad de conidias que son capaces de germinar obteniendo un promedio de 95% de germinación, lo cual es aceptable bajo condiciones de laboratorio. Se midió la esporulación de las garrapatas en cámara húmeda para determinar la presencia de ***Beauveria bassiana*** donde se determinó de manera efectiva la presencia del hongo. En relación a la etapa de campo, se realizo en la hacienda La Esperanza ubicada a 24 km. de la ciudad de León, donde se aplicaron 400 gramos de preparado por 20 litros de agua a una población de 30 bovinos infestados con garrapatas en un rango alto, medio y leve, Se realizaron tres aplicaciones, en la época de lluvia que es donde se presenta las mayores incidencias del parásito, pudiendo observar que la mayor mortalidad se logró 8 días después de aplicado el producto. En el último recuento de la población de garrapatas el índice poblacional era igual al que obtuvimos en el primer recuento, esto debido a que el ganado circula por las mismas praderas y logra una reinfestación.

INDICE DE GRAFICAS

	Paginas
Gráfico 1. Patogenicidad de la cepa 114 de <i>Beauveria bassiana</i>, sobre adultos de <i>Bophilus microplus</i> UNAN-León, 2007.....	27
Gráfico 2. Porcentaje de esporulación de la cepa 114 de <i>B. bassiana</i> sobre adultos de <i>Bophilus microplus</i> UNAN- León, 2007.....	29
Gráfico 3. Contaminantes presentes en la producción del hongo <i>B. bassiana</i> en platos y bolsas. UNAN-León, 2007	30
Gráfico 4. Porcentaje de infección de <i>B. microplus</i> antes de la aplicación de <i>B. bassiana</i> en la finca la Esperanza, Mina el Limón, 2007.....	31
Gráfico 5. Porcentaje de infección de <i>B. microplus</i> Después de la primera aplicación de <i>B. bassiana</i> en la finca la Esperanza Mina el Limón, 2007.....	32
Gráfico 6. Porcentaje de infección de <i>B. microplus</i> después de la segunda aplicación de <i>B. bassiana</i> en la finca la Esperanza Mina el Limón, 2007.....	33

I. INTRODUCCION

El desarrollo de la ganadería en Nicaragua durante últimos 10 años se ha visto afectado por un incremento de enfermedades producida por parásitos externos, los cuales de acuerdo a diversos autores año con año adquieren cierta inmunidad a los productos químicos tradicionales utilizados en el control de parásitos externos ocasionando perdidas al productor y poniendo alto riesgo a los consumidores.

En relación con lo antes expuesto, las garrapatas son sin duda el ectoparásito que ataca a diversas especies animales, parasitan no solo a animales de sangre caliente desde el gorrión hasta el elefante sino también de sangre fría, tales como serpiente y ranas.

Son mas sanguinarias, es decir, la sangre es su único e indispensable alimento. Una garrapata puede chupar tanta sangre como para alcanzar 200 veces su peso inicial y crecer 2-3 mm hasta 20 mm. También son muy resistentes, pues de no encontrar animal huésped, algunas especies de esta familia pueden sobrevivir hasta dos años sin alimentarse de sangre.

Una alternativa para el control de este ectoparásito es el uso de hongos entomopatógenos de los que se conocen alrededor de 700 especies. a nivel mundial los géneros mas estudiados son *Beauveria sp*, *Metarhizium sp*, *Verticillium sp*, *Paecylomyces sp*, *Hirsutilla sp* y *Nomuraea sp*. (Alves, 1986, Rosas, 2000)

La ganadería cubre el 50% de rubros de exportación, producción y alimentación enfatizándose más en las zonas del norte, occidente, y centro.

La venta de animales se realiza en animales en pie y en canal en los mercados internacionales y locales.

Las garrapatas se han conocido y reconocido desde tiempos bíblicos no fue sino hasta la mitad del siglo 19 cuando la población mundial de ganado vacuno aumento rápidamente para alimentar a la población humana y en los grandes centros industriales que las enfermedades trasmitidas por estas y sus serios efectos debilitantes en el ganado llegaron hacer un problema.

El uso de garrapaticidas arsenicales fue el primer paso importante en el control de garrapatas. Otros fueron el uso exitoso del arsénico en la erradicación del *Boophilus annulatus* de la mayor parte de los Estados Unidos en 1940, la determinación de la resistencia del arsénico a finales de los años 1930 y la exitosa introducción de la sustancias químicas sintéticas (cloruros orgánicos y derivados órgano fosforico) para el control de la garrapata una década mas tarde.

En Nicaragua no existen referencias de la utilización de hongos entomopatógenos para el control de garrapatas en ganado bovino.

Se encuentra referencia de estudios no preliminares en Brasil, México, Estados Unidos y Cuba en los cuales estos estudios no se han terminados por lo que no hay resultados.

La realización de este trabajo, surge como una opción para facilitar a los ganaderos nuevas alternativas en la regulación de las poblaciones de garrapatas y con una visión de aceptabilidad en el exigente mercado mundial, al utilizar productos no químicos, dándole así a los productores mayores oportunidades de comercialización de los productos y sub- productos derivados de la ganadería. Se sabe que los hongos entomopatógenos poseen extrema importancia en el control de ectoparásitos, virtualmente todos los ectoparásitos son susceptibles a las enfermedades fungosas.

Por otro lado ya existen estudios que demuestran la resistencia de la garrapatas a diferentes ixodicidas químicos venenosos, de tal manera que se pone en riesgo no solo la salud de los animales si no también la del personal encargado de manipular estos productos.

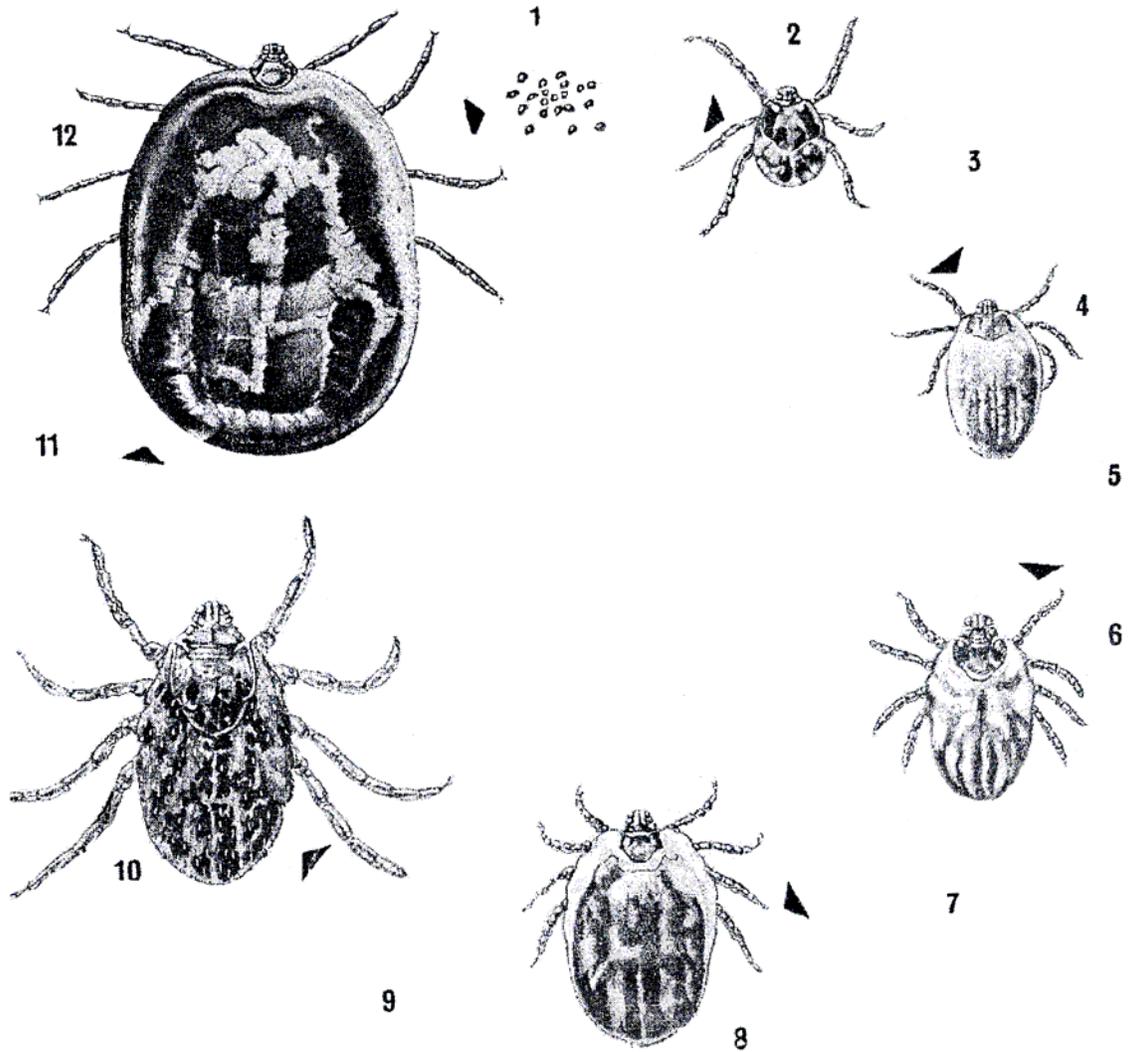
II. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la eficacia de la cepa 114 (*Beauveria bassiana*) para el manejo de garrapatas (*Boophilus microplus*) en el ganado bovino.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la susceptibilidad de (*Boophilus microplus*) al hongo entomopatógeno (*Beauveria bassiana*).
- Determinar el porcentaje Mortalidad de garrapata (*Boophilus microplus*) al ser infestada con la cepa 114 de *B. bassiana*.
- Evaluar la efectividad de la cepa 114 de *Beauveria bassiana*, sobre los parásitos de *Boophilus microplus* en el campo.

III. MARCO TEORICO



Descripción del ciclo de vida de la garrapata (*Boophilus microplus*), huevo, larva, ninfa, adulto. Según Serrano y Zambrana, 1989 División Agropecuaria.

3.1. Ciclo de vida de la garrapata

Según la literatura de Serrano y Zambrana (1989), hay tres fases móviles en el ciclo de vida de todas las garrapatas *Ixodidae* comunes del ganado vacuno: la minúscula larva de seis patas (2), la ninfa de ocho patas (6), y el adulto de ocho patas (10) (macho o hembra). Entre estas tres fases móviles hay dos fases mutantes (5) y (9) caracterizada por el desprendimiento de la piel exterior o cutícula y la reorganización del interior del cuerpo. El ciclo de vida se completa con la producción de huevos (1), puesto por la hembra después de haberse apareado y finalmente repleta de sangre(12), y de las cuales salen las larvas de la siguiente generación, en cada una de las fases móviles, la garrapata tiene que parasitar a un animal huésped, tal como la vaca y alimentarse de su sangre y fluidos orgánicos, esto lo consigue la garrapata perforando con sus partes bucales la piel del huésped y succionando su sangre, esta entonces puede mudar y pasar a la siguiente fase de su ciclo biológico. La larva (2) succiona sangre (3), se repleta (4) y muda o cambia (5), convirtiéndose en ninfa (6). Esta a su vez chupa sangre (7) y se repleta (8) antes de mudar (9), al adulto macho o hembra (10) (solamente en esta fase hay diferenciación sexual). Los adultos se aparean, generalmente sobre el huésped y la garrapata hembra (10), toma finalmente una abundante comida de sangre (11) y se repleta (12), antes de caer del huésped y encontrar en el suelo un lugar húmedo y protegido donde poner sus huevos.

3.1.1. Los huevos (Serrano y Zambrana S.A. división agropecuaria, 1989)

Según Serrano y Zambrana (1989), las hembras repletas de las especies importantes del ganado vacuno ponen de 2000 a 20000 huevos los huevos no eclosionan si están dispuestos a una constante humedad o temperaturas bajas, las temperaturas altas favorecen una eclosión rápida siempre que la humedad sea adecuada para prevenir el desecamiento de los huevos.

3.1.2. Larvas y las ninfas

Las larvas de 6 patas, encuentran un huésped subiéndose a las partes altas de la vegetación y adhiriéndose a cualquier animal que pase. Puede ser un huésped de elección o cualquier otro animal, pero como el ganado confinado es criatura de hábitos fijos, con frecuencia pasará por donde cayó la generación anterior de garrapatas y de este modo proveerá un huésped apropiado para la generación siguiente.

Las larvas pequeñas causan infestaciones moderadas, por su tamaño diminuto se dificulta la visibilidad sobre el huésped, por lo que se recomienda hacer revisiones periódicas de los animales, ya que estas nos determinaran las poblaciones de garrapatas adultas.

3.1.3. Los adultos

Los adultos se diferencian sexualmente, y generalmente se aparean sobre el huésped. Aunque en varias especies se ha observado un ciclo partenogenético (en el cual la hembra se alimenta y pone huevos sin necesidad de fertilización), esto, es sin embargo, un caso excepcional. A continuación de la fecundación, y generalmente condicionado ha que esta haya tenido lugar, la hembra toma una última abundante comida de sangre y cae al suelo a buscar un nicho donde poner sus huevos. Los machos mueren un tiempo después de el apareamiento.

3.2. Ciclo de vida de la garrapata del ganado vacuno de un solo huésped, (*Boophilus. sp*) (Manual práctico del hacendado, 2002)

1. La larva emerge de los huevos puestos en la tierra. De siete a diez días después entran a la vegetación en busca de un huésped.
2. Las larvas se fijan al huésped y engordan a expensas de la sangre. Luego entran en estado de muda. Dos días más tarde las ninfas emergen de la muda y también se alimentan a base de sangre por espacios de cinco a seis días.
3. Las ninfas repletas entran en estado de muda, el cual dura dos días y emergen adultos, machos y hembras. La fertilización se lleva a cabo y luego la hembra realiza una abundante ingestión de sangre.
4. La hembra repleta cae al suelo, veinte o más días después de haberse fijado como larva. Busca un lugar adecuado para poner sus huevos. Cada hembra pone aproximadamente 2000 huevos en un lugar húmedo del suelo.

3.3. Las garrapatas más comunes

Serrano (1989), nos menciona la lista de garrapatas de mayor importancia ganadera, ya que solamente unas cuantas especies presentan un problema económico internacional. Hay un mayor número de especies de importancia económica local como la *Amblyoma americanum*, la garrapata llamada vulgarmente "estrella solitaria, de los estados meridionales de los Estados Unidos. A continuación haremos mención de las garrapatas que se encuentran en América Central y las más dañinas en el orden (*B. microplus*).

Según Serrano y Zambrana (1989), nos dicen según su orden e importancia

Nombre científico: *Boophilus microplus*

Nombre común: Garrapata de ganado vacuno

Distribución: Asia, Australia, México, América Central y del Sur, Indias Occidentales.

Nombre científico: *Boophilus decoloratus*
Nombre común: Garrapata azul
Distribución: Sur del Sahara en África.

Nombre científico: *Boophilus annulatus*
Nombre común: Garrapata de la fiebre de Texas.
Distribución: América Central y América del Norte.

Nombre científico: *Ablyomma cayennense*
Nombre común: Mostacilla.
Distribución: Texas, México, América Central.

Nombre científico: *Otobius megnini*
Nombre común: Garrapata espinosa de la oreja.
Distribución: América Central, América del Norte y América del Sur.

3.4. Transmisión de enfermedades y parálisis por la garrapata

La Organización de las Naciones Unidas (2003), en sus estudios nos dice que las garrapatas son causantes de propagación y mantenimiento por todo el mundo de gran número de enfermedades humanas y animales. Muchas de estas enfermedades no han sido estudiadas o lo han sido solamente en parte, y con frecuencia, no están bien establecidas las relaciones entre las garrapatas y la enfermedad.

Hay, sin embargo, varias enfermedades clásicas del ganado vacuno transmitidas por las garrapatas, que tienen una importancia local o general. Lo que hace que la infestación de la garrapata constituya un problema para el ganadero, es tanto la pérdida del ganado vacuno doméstico causadas por estas enfermedades como por la misma acción directa de la garrapata.

Cuando el vacuno adquieren una enfermedad transmitida por las garrapatas las pérdidas se pueden ver reflejadas, tanto en mortalidad de los mismos lo que ocasiona la disminución del hato ganadero, o bien pérdidas en el rendimiento de producción de leche, o ganancia de peso diario.

La parálisis producida por la garrapata, o toxicosis, se diferencia claramente de la fiebre de la garrapata, en que en la primera, el factor causante es sustancias tóxicas y no un organismo patógeno.

Diferentes tipos de mamíferos pueden ser paralizados por una sola especie de garrapatas y varias especies de garrapatas pueden causar parálisis a un solo huésped.

La parálisis que no es una condición común en el ganado vacuno, se produce por la introducción de toxinas en el cuerpo del huésped con las secreciones salivares que la garrapata introduce al alimentarse.

La severidad de la parálisis depende de la susceptibilidad del huésped (el hombre es altamente susceptible; el ganado vacuno no tanto), y de la cantidad de toxinas que se haya introducido. En el ganado vacuno la parálisis es con frecuencia proporcional al tamaño de la infección de la garrapata mientras que en hombre una garrapata puede producir todo el daño.

3.4.1- Enfermedades conocidas en América Central

Zambrana (1989), También menciona que las enfermedades mas conocidas y agente causal.

Enfermedad: Babesiosis, Piroplasmosis, Hemoglobinuria bacilar, Fiebre de Texas, Ranilla Roja.

Garrapatas portadoras: *Boophilus spp.*, *Rhipicephalus bursa*, *R. evertsi*, *R. appendiculatus*, *Ixodes ricinus*

Organismos causantes: *Babesia bigemina*, *B. argentina*, *B. divergens*

Periodo de inoculación: 7-20 días

Síntomas: Hipertermia, inapetencia, hemonoglobinuria, anemia, ictericia, enflaquecimiento, muerte.

Distribución: México, América Central, América del Sur.

Enfermedad: Anaplasmosis, Fiebre, Biliosas del ganado vacuno, Ranilla Blanca

Garrapatas portadoras: *Boophilus spp*, *Dermacentor spp*, *Rhipicephalus bursa*, *R.simus*, *R. sanguíneus*.

Organismos causantes: *Anaplasma marginale*

Periodo de incubación: 15 - 40 días

Síntomas: Hipertermia, inapetencia, anemia, constipación (con heces duras y brillantes), ictericia, desmejoramiento, muerte.

3.4.2. Identificación de las garrapatas

Esta misma organización nos dice como identificarlas, es difícil dar descripciones verbales claras que sirvan de guía para la identificación de las diferentes especies de las garrapatas. Las larvas y ninfas pasan con frecuencia desapercibidas para personas que no están acostumbradas a identificarlas, Ya que para esto se requiere del conocimiento de un taxonomista experto en la materia.

La identificación de las especies resulta mas difícil y se necesita cierta experiencia, pero para los propósitos de el ganadero le basta el reconocimiento genero. Para apreciar el riesgo potencial de la enfermedad y tomar las medidas necesarias para controlar la infección.(Manual para el personal auxiliar de sanidad animal, FAO.(2003))

3.4.3. Por que se deben destruir las garrapatas

De todos los parásitos externos, las garrapatas causan en el mundo las pérdidas económicas más grandes en la producción ganadera, las pérdidas por enfermedad y toxicosis constituyen solamente una parte del daño causado por las garrapatas en la explotación ganadera.

La otra parte, aunque no se aprecie tan claramente es probablemente mayor. Se trata del perjuicio físico causado al animal por la presencia de las infestaciones de garrapatas causando las bajas de la producción.

Este perjuicio físico, es producido por varios factores tales como la pérdida de sangre que es de 1 a 3 cc. por cada garrapata que cumpla su ciclo de vida en un animal.

La irritación causada provoca el lamerse y rascarse del animal, lo que obstaculiza el proceso de alimentación, el daño en la piel y la predisposición del animal a las infecciones fungosas y bacterianas, y otros parasitismo, tales como los ataques de la mosca gusanera, provocada por las heridas producidas en la piel del animal por las picaduras de las garrapatas.

En infestaciones masivas, la multiplicación de estos factores causa un colapso total del estado físico del animal. (Publicación de Cooper, 1998)

3.4.4. El uso de productos químicos para el control de las garrapatas (Publicación de Cooper (1998))

Un ixodicida eficaz tiene que ser no solamente capaz de matar las garrapatas, si no que tiene que ser seguro al ser usado por las personas, para el tratamiento del ganado tiene que ser estable y retener sus propiedades ixodicidas durante mucho tiempo después de haber sido mezclado con el agua. También que tiene que pertenecer activo cuando el líquido de los bañaderos se encuentren sucio a causa de su contenido de barro, estiércol, orina, pelos y estar contaminado por bacterias.

Los ixodicidas más frecuentemente usados, se venden como concentrados líquidos, los cuales se diluyen con agua para formar una emulsión antes de ser usados para bañar o para rociar, después de la dilución la mezcla se conoce con el nombre de líquido para rociar o líquido para bañar.

Se deben seguir siempre cuidadosamente las instrucciones que se dan en las etiquetas para la dilución, de modo que el líquido final para bañar o para rociar, contenga la concentración correcta de ixodicida para que de buenos resultados. Si

el concentrado se diluye con demasiada agua, el líquido resultante no contendrá suficiente sustancia química para matar eficazmente las garrapatas, y si no se agrega suficiente agua puede haber riesgo de toxicidad para los animales que bañen o rocían. (Cooper, 1998)

3.4.5. Selección de garrapaticida

Muchos productos químicos se usan como ixodicida y varios concentrados que se venden con diferentes nombres comerciales pueden contener las mismas sustancias químicas como ingrediente activo. La concentración de la sustancia química contenida en el concentrado puede variar de acuerdo con los diferentes productos. El concentrado vendido por una compañía puede contener, por ejemplo, un 20% de ingrediente activo, mientras con el vendido por otras compañías pueden contener un 30%. El primero será posiblemente más barato al venderse como concentrado, pero el segundo tendría una proporción más alta de dilución para dar la misma concentración de ingrediente activo en el líquido para bañar. Por lo tanto, al comparar el costo de los líquidos para baños, no debe hacerse la comparación entre los costos de los concentrados sino entre el costo de 500 litros de líquido diluido. (Servicios Nacional de Sanidad Agraria – SENASA,2003)

Los concentrados de garrapaticidas, además de contener un ingrediente activo o ixodicida contienen disolventes y emulcificantes o agentes humectantes que influyen materialmente la eficacia del producto, estos se conocen con el nombre agentes formulantes. Las propiedades humectante de los baños la estabilidad de la emulsión, la tasa de agotamiento y las propiedades exterminadoras del ixodicida son afectadas, todas ellas, por los agentes formulantes y estos deben encontrarse en la proporción correcta si se quieren obtener los efectos máximos con el tratamientos. Los preparados para la agricultura o para rociar cosecha no tienen proporción correcta de agentes formulantes para usarlos como baños de inmersión y no deben usarse, en absoluto, en una manga rociadora o en un baño de inmersión, ya que probablemente resultarían tóxicos o ineficaces o ambas cosas a la vez.(Servicios Nacional de Sanidad Agraria – SENASA,2003)

3.4.6. Resistencia a los ixodicidas

Serrano y Zambrana 1989 también nos dice que la resistencia es un problema constante en el control químico de insectos, garrapatas y ácaros.

En toda población pueden existir individuos o puedan aparecer espontáneamente, que pueden enfrentarse mejor a los venenos químicos, de modo que sobrevivan al tratamiento y pasan luego a sus descendientes su habilidad para sobrevivir.

Aunque la habilidad de estos individuos para sobrevivir se deriva generalmente de la alteración de un proceso bioquímico, la existencia y herencia de estos procesos son controladas genéticamente, y el hecho de que algunas veces se presenten espontáneamente puede ser debido a una mutación o cambio de genes.

Esta habilidad especial de supervivencia se difunde entre las garrapatas por que el insecticida o ixodicida extermina las susceptibles y la habilidad de supervivencia es heredada por la descendencia de las sobrevivientes.

Cuando una gran proporción de las garrapatas sobreviven a una aplicación del ixodicida, se dice que estas garrapatas son resistentes.

Cuando esto sucede en una granja, el único curso de acción posible de emplear otro ixodicida, el cual se encargara de destruir las garrapatas existentes, ya que el aumento de concentración de garrapaticida que se usa raramente resulta eficaz y puede producir toxicidad en animales así tratados.(Serrano y Zambrana, 1989)

3.4.7. Resistencia de las garrapatas en todo el mundo

Serrano y Zambrana 1989, nos dicen que existen especies de garrapatas que son resistentes a los productos quimicos utilizados para las garrapatas. *Boophilus microplus* está resultando ser la especies de garrapatas mas resistentes siguiéndole, *Boophilus decoloratus*, y no hay duda de que con los tratamientos modernos intensivos otras especies seguirán adquiriendo resistencia.

Una ves que haya obtenido resistencia, no hay nada que se pueda hacer prácticamente, para volver las garrapatas a su estado original de susceptibilidad pero hay mucho que se puede hacer para demorar el desarrollo de la resistencia.

Un tratamiento cuidadoso y minucioso mantiene el número de las garrapatas a un nivel bajo y una atención al correcto intervalo entre los diferentes baños asegura que hasta donde sea posible, se ataque en etapas susceptible de la garrapatas.

Estos dos procedimientos reducen la probabilidad de resistencia, pero no pueden garantizarse de prevenirla, ya que las garrapatas desarrollan unos niveles de resistencia muy altos, que ninguna precaución posible podría prevenir.

Sin embargo, se puede usar un compuesto con resultados satisfactorios durante muchos años, se utiliza con cuidado, antes de ser sobrepasado por las resistencia de las garrapatas. (Serrano, Zambrana, 1989)

3.5. Control microbial

Es la utilización de microorganismos Entomopatógenos o sus productos que sirven para disminuir las densidades poblacionales de insectos plagas dentro de estos microorganismos se incluyen bacterias, hongos, virus, nematodos, rickettsia (Alves,1986)

3.5.1- El hongo *Beauveria bassiana*

El genero mas estudiado para el control de plagas es el género: *Beauveria bassiana*, fue uno de los primeros hongos entomopatógenos en ser descrito, desde 1836 se lo conoce como el agente causal de la "muscardina blanca" en el gusano de seda *Bombix mori*, desde entonces es considerado como candidato importante en el control microbiológico de insectos. Bassi de Lodi en el año 1836, quien descubrió el hongo, mostró la naturaleza patogénica y contagiosa del hongo infectando el gusano de la seda y también desarrolló medidas para controlar la enfermedad, en su honor, Bálzano describe y nombra al hongo *Botrytis bassiana*, por su parte Vuillemin (1912) creo el genero *Beauveria* y selecciono ***bassiana***, como especie tipo. (Rosas, 2000)

Las especies del género ***Beauveria*** son principalmente parásitos de insectos, es conocido por su amplio rango de hospedero y distribución geográfica, su patogenicidad se ha probado contra más especies de insectos que cualquier otro hongo (Gallegos et al 2003)

3.5.2. Morfología

Beauveria bassiana, se encuentra atacando a más de 200 especies insectiles de diferentes ordenes. Tiene conidios globosos o subglobosos, conidióforos formando densos cachos, posee una caja de micelio blanco algodonoso que envuelve al insecto, con granulaciones pequeñas del mismo color. Puede ser capaz de iniciar epizootias a densidades altas y bajas del hospedero (Alves, 1986).

3.5.3. Taxonomía:

Reino: **Mycetae**
División: **Amastigomicotina**
Subdivisión: **Deuteromycotina**
Clase: **Deutermycetes**
Subclase: **Hypomycetes**
Orden: **Moniliales**
Familia: **Monileaceae**
Género: **Beauveria**
Especie: **bassiana**
(Gallegos et al 2003)

3.5.4. Patogenicidad y virulencia

La patogenicidad, es la capacidad de un organismo en provocar una enfermedad. Es un atributo cualitativo, es decir, un microorganismo puede o no ser patogénico. Otro término muy utilizado es virulencia, y esto se refiere a la intensidad o grado de la enfermedad, este parámetro es relativo y tiene que ser comparado con otras cepa sobre el mismo hospedero. La virulencia, es expresada como porcentaje de mortalidad en dosis letal cincuenta DL50 o concentración letal cincuenta CL50. (Lecuona en 1995).

Generalmente, la expresión de mortalidad se evalúa en el porcentaje de esporulación de los individuos expuestos al inóculo. En los bioensayos con *Cosmopolitaes sordidus*, el desarrollo de la infección se observa aproximadamente 35 días después de la inoculación y los porcentajes de esporulación varían entre 17- 80% (Jiménez en el 1994)

3.5.5. Modo de acción de *Beauveria bassiana*

En cuanto al mecanismo específico de acción, los hongos entomopatógeno actúan principalmente por contacto, el hongo es capaz de penetrar dentro del insecto e invadirlo, provocándole la muerte por micosis. Además la mayoría de estos hongos producen sustancias líticas y toxinas, que ayudan a la penetración y a inhibir los mecanismo de defensa de los insectos, aunque cuando muchas de estas toxinas se producen dentro del insecto. Se ha demostrado de que muchas especies de hongos pueden producir durante su reproducción metabolitos bioactivos con efectos insecticidas, lo que potencia su acción.

Según Alves (1986), la etapa en el desarrollo de una micosis puede simplificarse en las siguientes etapas:

1. Germinación del conidio.
2. Formación del apresorio.
3. Penetración.
4. Colonización.
5. Reproducción del patógeno

3.5.5.1. Germinación

Una excelente germinación ocurre en 12 horas, con temperatura de 23-30°C y una humedad relativa de un 80%; requiriendo de fuentes de nitrógeno, carbono, y energía para la formación de tubo germinativo. La habilidad del hongo para utilizar estos elementos está en función de su agresividad, virulencia, cantidad de esporas (requeridas para matarlos), tiempo de germinación y penetración, después de la adhesión de la cutícula del hospedero. (Clark,1986 Smith y Grula, Leger, 1981 Citado por Rosas, 2000).

3.5.5.2. Formación de apresorios

En el extremo del tubo germinativo ocurre una dilatación de hifas formando una estructura denominada apresorio, esta estructura puede ocurrir en *Beauveria sp*, *Nombrasa* y *erinia sp* este tubo germinativo penetra por aberturas naturales del insecto (tránqueas, poros y regiones intersegmentales).

3.5.5.3. Penetración.

El crecimiento superficial 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 esporas a través de la cutícula, indican alguna forma de reconocimiento químico como prerrequisito para la penetración.

La penetración, está dividida en dos procesos principales; 1) Físico: es cuando la hifas rompen áreas membranosas o esclerosadas y 2) Químico: es cuando el hongo produce enzimas como las proteasas, lipasas y quitinasas que facilitan la penetración mecánica.

Alrededor del área de penetración, aparecen síntomas de histólisis (descomposición por los tejidos por la acción de enzimas). El aparato bucal, ano y regiones intersegmentales, son probablemente las áreas más comunes de penetración.

3.5.5.4. Colonización

A partir de la penetración inicia un proceso de colonización del hospedero, de ese momento son formadas pequeñas colonias de cuerpos hifales que se van engrosando y ramificando, la colonización inicia en el hemocele del insecto y luego pasa al resto del cuerpo como: los cuerpos grasos, sistema digestivo, tubos de malpighi, sistema nervioso, músculos y tráqueas. El tiempo de colonización podría variar entre 76-120 horas dependiendo del patógeno, del insecto y las condiciones ambientales.

3.5.5.5. Reproducción del patógeno

Después de 4 a 5 días de muerto el insecto, comienza a emerger de hifas por los espiráculos y regiones inter segmentales y después de 24 a 48 horas la emergencia de las hifas, se inicia la formación de conidias, esto se logra dependiendo del patógeno, temperatura, humedad y radiación ultra violeta.

3.5.6. Síntomas

Los síntomas iniciales de las enfermedades, pueden aparecer como manchas oscuras en las piernas, regiones ínter segmentales y distribuidas por todo el tegumento. El insecto deja de alimentarse tornándose flaco y desorientado.

Posteriormente el tegumento, se torna rozado dependiendo del hongo (*B. bassiana* o *M. anisopliae*), para después tomar una coloración blanquizca debido al crecimiento del micelio. Esto cubre toda la superficie del cuerpo, iniciando por los espiráculos y áreas intersegmentales. El crecimiento miceliar se da por condiciones de temperatura y humedad favorable. La esporulación y conidiogénesis del hongo que pueden ser reconocidas por la formación polvorienta, que recubre todo el cuerpo de cadáver. El cadáver presenta en esta fase, coloración variable con forme la especie del hongo que causa la enfermedad. (Alves,1986).

3.5.7. Reproducción del hongo *Beauveria bassiana*

Para iniciar la producción del hongo entomopatógeno se utilizan medios de cultivo, los cuales son preparaciones sólidas, semilíquidas o líquidas que suplen de las necesidades nutricionales para el desarrollo del hongo. Las exigencias nutricionales dependen del tipo de hongo en estudio, pero en general se deben considerar los siguientes elementos. 1) El agua, que participa en todos los intercambios iónicos que ocurren dentro y fuera del organismo, 2) Las fuentes de carbono, que se utilizan como fuente de energía, los más comunes son: carbohidratos, grasas y proteínas. 3) Fuentes de nitrógeno, que se obtiene a través de las sales de nitrógeno, peptona, potasio, amonio, sulfato de amonio o cloruro de amonio. Existen otros elementos no menos importantes para el desarrollo del hongo, estos son los micro nutrientes como zinc, magnesio, cobalto, y cobre y macro nutrientes como fósforo, potasio, azufre, sodio, cloro y hierro. Las funciones de los macro y micro nutrientes no están aclaradas completamente.

Los medios de cultivo se clasifican de acuerdo a **1) Su uso**, en **medios comunes**, son aquellos que poseen nutrientes generales que sirven para el crecimiento de un amplia gama de hongos y **medios especiales**, son aquellos cuyos componente son específicos, para el crecimiento de ciertos hongos y son llamados también medios selectivos. **2) Su origen**, en **medios naturales**, son aquellos medios realizados con sustancias naturales como leche, carne, sangre, arroz, trigo, Papa y **medios artificiales**, son aquellos preparados de forma química en presentaciones generalmente en polvo. **3) Su consistencia**, se dividen en **medios sólidos**, medio que se adiciona agente aglutinante como gelatina y/o agar y **medios líquidos**, tiene la misma proporción de sólido, excepto los agente aglutinantes.

Los medios más utilizados en patología de insectos son: SDA (Sabouraud-dextrosa-agar), SDAY (Sabouraud –dextrosa-agar –extracto de levadura), MAY (Sabouraud- maltosa- agar –levadura), MEA (Extracto de malta –agar),

PDA (Papa-dextrosa-agar), APA (Agar –Papa- azúcar), AA (agar-agua), AAA (agar- agua- acidificado), NA (agar –nutritivo). El medio mas utilizado para la producción de hongo entomopatígeno es PDA, el cual puede ser elaborado en laboratorio o ya viene preparado. El PDA preparado en laboratorio lleva 300 gramos de Papa, las cuales son hervidas hasta obtener una infusión que se le agrega 20 gramos de dextrosa y 20 gramos de agar y luego sometidos a esterilización a 121 °C por 20 minutos. Cuando ya viene preparado se agrega 38 gramos de agua y luego se esteriliza. (Alves,1986)

Una vez que se ha seleccionado el medio de cultivo adecuado, se pasa a la inoculación del hongo en el medio de cultivo, para que las estructura reproductiva inicien se crecimiento.

Las fuentes de inculo más comunes son las naturales como el suelo, material vegetal, insectos momificados, y fuentes artificiales como cultivos puros, matrices, material preservado y bolsas.

Para iniciar la producción masiva de hongo y sus estructuras reproductivas (conidias y esporas), se utilizan sustrato como maíz, arroz, trigo, soya, fríjol, cebada, sin embargo los que han dado mejores resultados son los de arroz y trigo. Existen tres métodos para la producción masiva del hongo, la producción industrial, y la artesanal. De los tres procesos de producción el semi industrial ha sido el método más utilizado, este consiste en varias etapas que a continuación describimos brevemente.

1) Aislamiento del hongo

Consiste en la obtención del hongo a partir de la fuente de inculo

2) Elaboración de cultivos puros (6 días)

Consiste en la limpieza de platos inoculados y el rehilamiento a partir del inculo original.

3) Preparación de matrices y bolsas

En la matriz se utiliza 100 gramos de arroz pre cocido entero como sustrato, el cual es colocado en erlenmeyer de vidrio se sella y se esteriliza a 121 °C por 20 minutos.

4) inoculación e incubación de matrices (6 días)

El objetivo de producir matrices es tener suficiente material para inocular las bolsas. Las matrices, se inoculan tomando un plato de cultivo puro, el cual es raspado y se le agrega 60 ml de agua destilada, esto es suficiente para inocular 4 matrices. Las matrices, son incubadas en cuartos oscuros a temperatura entre los 24 a 28 °C por 8 días.

5) Inoculación e incubación de bolsas (4 a 6 días)

Las bolsas, son inoculadas a partir de las matríces a la cuales se les agrega 750 ml de agua destilada con extravón al 0.1% Cada bolsa es inoculada con 20 cc de la suspensión fungosa, con una matriz se inoculan aproximadamente 37 bolsas, las cuales son incubadas por un período de 4 a 6 días.

6) Proceso de secado (15 días)

El objetivo de esta fase, es la eliminación de la humedad del hongo. El arroz contenido en las bolsas, es depositado en bandejas plásticas grandes con orificios en el fondo y colocadas a temperaturas ambiente para secar. El hongo está listo cuando tiene de 4 a 6 % de humedad (Barrientos, 2002)

7) Cosecha del Hongo (1 día)

La cosecha consiste en separar el sustrato (arroz), de las estructuras del hongo y recolectarlas en forma de polvo de conidias. Generalmente existen equipos mecánicos para la cosecha pero en Nicaragua se realiza utilizando Cribas de diferentes numeración para separar por frotación, las partículas del hongo del sustrato. Una vez cosechado debe mantenerse en refrigeración ya que la luz, humedad, y altas temperatura afectan la actividad de conidias.

Después de cosechado hay que evaluar el rendimiento, el cual se refiere a la cantidad de gramos de polvo de conidias cosechado, al número de conidias por gramo de polvo y la viabilidad de las conidias.

8) Formulación (1 día)

La formulación del hongo, es el proceso mediante el cual el ingrediente activo (conidias), se mezcla con materiales inertes, los más utilizados son: Vehículos, solventes, emulsificantes, emulcificantes y aditivos.(Barrientos 2002).

Esto se hace para homogenizar las partículas del hongo para poder manipularlas y aplicarlas adecuadamente. Hasta el momento se han desarrollado 2 tipos de formulaciones: en polvo mojable y líquidos emulsificable. Los materiales utilizados en la formulación deben presentar algunas características como:

- No tener actividad biológica.
- Inocuo al medio ambiente.
- Características físicas.
- Facilitar la aplicación del producto.
- No afectar la actividad del hongo.
- Económicamente rentable.

Para finalizar el producto debe de ser empacado en recipientes que no permitan la entrada de luz y de humedad ya que estas afectan la actividad y calidad del producto (Barrientos, 2002)

3.5.8. Uso del hongo entomopatógeno en el control de plagas en el campo

Durante muchos años el uso del hongo entomopatógeno para el control de plagas estuvo limitado y prácticamente olvidado debido a sus requerimientos de alta humedad relativa y altas temperaturas para desarrollarse adecuadamente (Sterret y Henry 1990, Citado por Barrientos, 2002)

El método de la aplicación depende en el principio de la formulación disponible, o bien la formulación debe de ser compatible con el método de la aplicación.

Estudios de campo muestran que la infección por hongo entomopatógeno ocurre de tres maneras.

- a) Al contacto de la plaga con el producto aplicado (impacto directo), el porcentaje de infección y mortalidad por medio del impacto directo varia entre 30 a 90 %.
- b) Infección secundaria de residuos de insecticida de la vegetación o suelo, este mecanismo de infección puede ser mas importante que el del impacto directo, sin embargo, en el caso de micoinsecticida, es influenciado por la aplicación, formulación y variables ambientales.
- c) Transmisión horizontal o ciclo secundario del patógeno de individuos infectados por impacto directo o infección secundaria, los cuales al morir esporulan y liberan esporas al medio ambiente (Jenkins et al 1998, Charnley 1992, Lomer et al 2001 citado por Barrientos, 2002).

Los hongos entomopatógenos, con frecuencia se reportan como efectivos en el laboratorio y pocos efectivos en el campo (Milner, 2000 citado por Barrientos 2002). Ello se debe a la gran cantidad de factores que se presentan en el campo y afectan a la efectividad del hongo, siendo estos factores difíciles de controlar y diferentes de los que se presentan en el laboratorio. Entre los diferentes factores la relación hospedero-patógeno tenemos Luz solar, temperatura, humedad, precipitación, edad del hospedero, viabilidad del patógeno, dosis aplicada, radiación ultravioleta, comportamiento de la plaga y densidad de la cubierta vegetal. Estos factores interactúan, para producir una efectividad optima y frecuentemente limitan la efectividad de un mico insecticida. (Milner et. Al 2000, citado por Barrientos, 2002).

El potencial de uso de *Beauveria bassiana*, fue demostrado en los estudios de Mclaughlin en 1989, quien señaló que puede infectar pupas, larvas, y adultos del picudo del algodón y que la mortalidad es de 69 a 100 %, después de 5 días de inoculado con una dosis de 3.2×10^8 conidias x gramo (maclaughlin en 1989, citado por Quiroz , 1994).

Estudios realizados en Nicaragua en el centro experimental del algodón (CEA), utilizando 7 aplicaciones de la formulación NATURALIS de *Beauveria bassiana* contra picudo del algodón, obtuvieron resultado hasta del 47 % de reducción en la población. (Jiménez, 1994).

Utilizando dos tipos de formulaciones de *Beauveria bassiana* en el campo, una con agua y otra con aceite mineral para el control del picudo del algodón, encontraron que no hubo diferencia significativa entre las dos formulaciones. Al comprobar que no hubo diferencia significativa se utilizó, una formulación de *Beauveria Bassiana* en agua y se comparó con el control químico metilparatión, ambos obtuvieron mortalidad del 47 a 60 %, el cual no hubo diferencia significativa y se puede utilizar *Beauveria bassiana* con los mismos resultados.

Sin embargo estudios de persistencia realizados sobre plantas de algodón nos indican que entre las 48 y las 72 horas después de inoculado el hongo se logra mantener cerca del 40-50 % de inóculo, con una viabilidad de las conidias de el 30% . Esto nos lleva a la conclusión de buscar soluciones encaminadas a la formulaciones de manera que se asegure la persistencia del patógeno por mayor tiempo en el campo, para lograr un manejo más efectivo de los insectos plagas que se desean manejar con e control microbial (Jiménez, 1994).

3.6.0. Característica o propiedades de un patógeno para ser efectivo como bioinsecticida.

El paso inicial para desarrollar un insecticida microbiológico, es la selección de un aislamiento que sea altamente patógeno y virulento para la plaga a controlar y que tenga un rango de temperatura similar al de la plaga. Para que los patógenos sean efectivos como bioinsecticida y pueda realizarse su comercialización, deben poder producirse de manera fácil y barata, deben ser de bajo riesgo, específico para la plaga a controlar, deben poder aplicarse con tecnologías convencionales de manera que puedan tener un período de vida adecuado en almacén y deben ser de rápida acción. (Goettel y Roberts 1992, Milner y Hunter 2001,citado por Barrientos 2002).

Uno de los descubrimientos que mas facilito del desarrollo de **Beauveria** como miconinsecticida es que las conidias son **hidrofóbicas y liposolubles**, por lo tanto pueden suspenderse en aceite fácilmente. Los aceites se pueden dispersar y penetrar la epicuticula de los insectos, ya que tienen una alta proporción de cera, y evita la deshidratación de las conidias favoreciendo la germinación cuando la humedad relativa es baja.

Esta característica ha permitido desarrollar la tecnología para formular en aceite vegetal o mineral las conidias del hongo **Beauveria** (Prior et. Al. 1992, Lomer et al 2001 Milner y Hunter, 2001, citado por Barrientos ,2002).

3.7.0 Ventaja de hongo entomopatógeno

Los agentes microbiológicos, en particular los hongos entomopatógenos, ofrecen varias ventajas en el control de plagas: bajos costos de producción, bajo impacto ambiental, en particular no tiene efectos secundarios sobre organismos acuáticos y animales de sangre caliente, son más selectivos que los productos químicos, adecuada para utilizarse en áreas de producción orgánica y en áreas protegidas, la eliminación de residuos es relativamente fácil, basta con exponer el producto un par de días al sol para que el producto se inactive casi totalmente. (Milner y Hunter 200, Jenkins et al 1998, citado por Barrientos, 2002).

3.8.0. Impacto ambiental de los hongos entomopatógenos

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), indican que hay efectos notable de **Beauveria bassiana** en insectos voladores (díptera, himenóptera, neuróptero, coleópteros) sin embargo, las abejas cortadoras de hojas de alfalfa son altamente susceptible a **Beauveria bassiana**.

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 hongo entomopatógeno, es necesario estudiar con precisión el efecto de los mico insecticidas disponible sobre insectos que no son plagas que coexiste con especies plagas, a la que se dirige el control.

(Milner y Hunter 2001, Kooyman et al 1997, Milner 2002 citado por Barrientos, 2002)

3.9.0 Uso actual y futuro de entomopatógeno

La tecnología para la formular y aplicar hongos entomopatógenos en forma eficiente y efectiva ha sido desarrollada. Sin embargo, esta tecnología necesita ser transferida y efectiva a países en desarrollo, donde los costos económicos y ambientales por la aplicación de productos químicos son extraordinarios, países como México y Brasil, están tratando de desarrollar su propia tecnología para el uso de hongo entomopatógeno en el control de plagas, usando aislamiento nativos y evitando la introducción de cepas exóticas.

Las autoridades responsables de la sanidad vegetal en países en desarrollo deben propiciar la transferencia de tecnología, lo cual permitirá que extensionistas como productores y técnicos de campo, familiaricen con el uso, aplicación y bondades de productos biológicos, sobre todo como un elemento importante en programa de Manejo Integrado.

Otro aspecto importante a considerar, para lograr el éxito de hongos entomopatógenos es el estudio del comportamiento, actividad diaria y capacidad termorregulatoria de las especies plagas a controlar, pues muchas de ellas pueden inactivar el efecto de entomopatógeno (Milner et al 2001 citado por Barrientos, 2002).

IV. MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó en dos etapas, una de laboratorio que se llevó a cabo en las instalaciones del Campus Agropecuario, en el Laboratorio de Hongos Entomopatógeno y la de campo se realizó en la hacienda La Esperanza en el Departamento de León.

4. Colección de las garrapatas

Para realizar el experimento se prosiguió a la recolección de las garrapatas *B. microplus*, del ganado bovino extrayéndolas y se colocaron en platos petri, esta se llevó a cabo en la comarca Guanacastal del municipio de Chichigalpa del departamento de Chinandega.

El estudio, se realizó en el Centro de Investigación y Reproducción de Control Biológico, ubicado en el Campus agropecuario de la UNAN-León a 1.5 kilómetros de la entrada a la Ceiba

4.1. Producción de conidias

La cepa a evaluar, se encontraba conservada en sílica gel en el laboratorio de hongo entomopatógeno, tiene un tipo de crecimiento uniforme con producción de conidias sueltas y crece muy bien en extracto de Malta Agar y Papa Dextrosa Agar (Quiroz, 1994).

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

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

4.1.2 Elaboración de medio líquido

Para la reproducción utilizamos la metodología de sustrato líquido de papa – dextrosa (PD), su elaboración consistió en lavar y pelar 300 g. de papas cortándose en trozos pequeños los cuales se pusieron a hervir por 20 min. para obtener la infusión, luego se filtró utilizando un embudo con algodón en la base, para no dejar pasar la papa después de enfriar se le agregó 10gr de dextrosa luego se mezcló bien el medio y se distribuyó en ocho erlenmeyer, colocando 200 ml en cada uno, luego se sellaron y se pusieron a esterilizar en la auto clave a 121°C y 15 libras de presión por 15 minutos (Alves, 1986).

4.1.3 Siembra del hongo

Se inició tomando un cultivo puro de la cepa 114 garrapata, con ayuda de una espátula debidamente estéril, se cortó un trozo del medio de cultivo sólido conteniendo el hongo y se colocó en el medio de cultivo líquido, una vez depositado el implante del hongo se colocaron los erlenmeyer en el agitador por un período de 5 días a 150 revoluciones por minuto cada erlenmeyer se marcó con la fecha y el código de la cepa.

4.1.4 Elaboración de bolsas

Se utilizó arroz 80% grano entero lo lavamos, luego se colocó a precocer sobre agua hirviendo por 15 minutos, posteriormente se dejó enfriar y se procedió al llenado de bolsas, colocando 200 g. en cada una de las bolsas de polipropileno, estas se sellaron y se pusieron a esterilizar en auto clave a 121°C por 20 minutos, en el cual se puso esterilizar 300 ml de agua más 0.5 gramo de extracto de malta más antibiótico, se esterilizó junto con el equipo, para inocular (jeringa veterinaria). Las bolsas se sacaron del autoclave y se dejaron enfriando hasta el día siguiente. (Gómez, 2007 comunicación personal)

4.1.5 Inoculación de las bolsas

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

1. Desinfestamos y encendimos la cámara de flujo laminar.
2. Colocamos el mechero encendido sobre la cámara y los materiales a utilizar (equipo de inoculación, las bolsas, el agua y el medio líquido conteniendo el hongo).
3. Nos desinfestamos las manos con alcohol.
4. Armamos el equipo, para inocular e introducimos la sonda dentro de la solución fungosa.
5. Perforamos las bolsas sobre un círculo objetivo y depositamos 20 ml de solución fungosa en cada una de las bolsas bien distribuido.
6. Sellamos y agitamos las bolsas.
7. Extrajimos las bolsas de la cámara, se rotulan con la fecha y el número de la cepa del hongo utilizado.
8. Colocamos las bolsas en el incubador.

4.2 Control de calidad de la producción

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

4.2.1 Conteo de Blastosporas

El conteo de blastosporas, se realizó tomando muestras del hongo de cada erlenmeyer y se colocaron en el homocitómetro (cámara de Neubauer), utilizando los cuadros pequeños que tienen un factor de 10^6 se contaron 5 puntos de la cámara, los extremos y el centro para hacer un total de 25 cuadros pequeños y 4 repeticiones por muestra. Se realizó la fórmula propuesta por Alves (1986), para obtener la concentración de la suspensión.

La fórmula utilizada fue la siguiente:

$X \cdot 25 \cdot 4 \cdot 10^6$ volumen de la dilución.

x: promedio de conidias de las repeticiones.

25: número de cuadrante contado.

$4 \cdot 10^6$: factor de los cuadrantes pequeños (Diámetro/Profundidad/Volumen) (Alves, 1986).

4.2.2. Medición de la concentración de la suspensión fungosa

De los platos que presentaron el mejor crecimiento de la cepa 114 se seleccionó dos platos, se realizó un raspado de las conidias con una espátula estéril y se colocó en tubos de ensayo con 5ml de agua estéril. Se tomó un mililitro de esta solución y se le agregó Tween 20 al 0.01%, agitando para obtener una solución fungosa homogénea, el conteo de conidias se realizó utilizando los cuadros pequeños del hemocitómetro y la fórmula propuesta por Alves (1986), donde se logra conocer la concentración total de la suspensión.

$n \cdot 4 \cdot 10^6$

n: Número total de conidias observadas

4: Constante

10^6 : Constante

(Alves, 1986)

4.2.3 Prueba de viabilidad

La viabilidad se realizó, colocando en un plato petri con medio de cultivo (PDA) cuatro gotas de la suspensión del hongo y se evaluó la germinación a las 24 horas. Para determinar la esporulación de los insectos expuesto al inóculo, se montaron en cámaras húmedas.

4.3 Montaje del Bioensayo

Utilizando la metodología propuesta por Bustamante, 2006 y González et 2006. El método de utilización del bioensayo, es la inmersión de las garrapatas de ganado en la suspensión de conidias (sin Tween), durante 2-3 segundos, luego para quitar el excedente de la suspensión sobre los cuerpos, se colocaron en papel toalla. Se utilizaron 75 garrapatas adultas y ninfas por repetición para un

total de 150 garrapatas en los bioensayo, obtenidas directamente del ganado vacuno, por extracción simple, las que se mantuvieron en el laboratorio durante la infección experimental.

Se aislaron las cepas 114 de plátano de *Beauveria bassiana* en Papa-Dextrosa Agar - (PDA).

Las diluciones, se aplicaron sobre los estadios ninfales y adultos de *B. microplus*, Siendo la 10^8 conidias/ml, para determinar la concentración.

Finalmente, se determino:

La efectividad del hongo entomopatígeno como controladores de *Boophilus sp.*

4.3.1 Prueba de patogenicidad

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

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

4.3.2 Medición de la esporulación

Las garrapatas muertas se montaron en cámara húmeda, utilizando platos petri plásticos y círculos de papel toalla que son colocado en plato petri, se agregó de 2 a 3 gotas de agua estéril. Luego se colocaron las garrapatas muertas y se taparon, sellándolos y colocándolos en una incubadora que tenía una temperaturas de 27 °C y 80% de humedad relativa.

La revisión se hizo 3 veces por semana.

4.4. Estudio de campo

El estudio de campo se realizó en la finca La Esperaza ubicada a 5 km. de la carretera a la Mina el Limón municipio en el departamento de León, durante los meses de Julio y Agosto del 2007. El municipio Mina el limón de León en general, presenta un clima trópico de sabana con una pronunciada estación seca entre los meses de noviembre a abril y una estación lluviosa entre los meses de mayo a octubre con Temperatura promedio de 27 a 29°C, la humedad relativa entre 67% y 89%, esta hacienda se encuentra a una altitud de 700 msnm.

4.4.1. Descripción del trabajo de campo

Prueba de campo.

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

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

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

Debido al umbral poblacional muy alto no se pudo contabilizar las garrapatas lo cual nos llevó a focalizar, utilizamos la técnica propuesta por Balladares, 1983, donde expresa que al estar en presencia de una alta población, es imposible contabilizarla, lo cual conlleva a tomar muestreos visuales a traves de los siguientes parámetros referenciales:

Infección leve: 30 % de la zona estudiada.

Infección Media: 31% al 61% de la zona estudiada.

Infección Alta: 61% al 100% de la zona estudiada.

4.4.2. Obtención de los porcentajes de infección y recuentos

Para la obtención de los porcentajes e infección, se tomó al vacuno y se dividió en partes tomando en cuenta la zona ecológica de la garrapata (Balladares, 1983).

Se observó la parte más infectada, lo cual se realizo, con una cinta métrica, se mide el largo y ancho y se multiplicó la zona a evaluar, utilizando como parámetro contable los centímetros cuadrados, luego dicha zona se dividió en dos partes, para obtener diámetro de la zona estudiada, y mediante de una regla de tres se sacan los porcentajes dividiendo entre el área total.

4.4.3. Baños de los animales

Se depositó, en un recipiente 2 bolsas de producto de *Beauveria bassiana* para lograr una concentración de conidias de 4×10^{11} , se agregó un galón de agua y se procedió a desprender las conidias del sustrato, para así llegar a obtener una mezcla homogénea del producto terminado, luego se vertió en una mochila de presión de 20 l, rellenando después con agua, empezaron las aplicaciones por grupo y se llevo un registro por nombre de cada animal, según el propietario dichas aplicaciones se llevaron a cabo a partir de las 5 de la tarde en adelante para favorecer la efectividad del hongo.

V. Resultados y discusiones

5.1. Pruebas de patogenicidad

En la gráfico número, uno podemos observar el comportamiento de la mortalidad en el tiempo para los tres bioensayo, se observa que en el bioensayo uno, dos y tres las mortalidades inician a los tres días de inoculados las garrapatas alcanzando los mayores porcentajes de mortalidad en el quinto día con un 28%, en el bioensayo uno, con 38%, en el bioensayo dos y un 47% en el bioensayo tres, alcanzando mayores porcentajes los días cinco y siete después de inoculada las garrapatas, datos que coinciden con Gómez (1996) quien afirma que las mortalidades se logran en los primeros 20 días después de inoculado.

También es importante señalar, el bioensayo tres se logran las mayores mortalidades con un 95%, los siete días después de infectada en comparación con el uno y el dos que logra mortalidades similares en tiempos similares de siete y once días.

Según Alves (1986), la patogenicidad esta afectada por el estado de susceptibilidad del hospedero, y las condiciones ambientales del bioensayo, por lo que, se pueden tener respuestas de mortalidad diferentes con el mismo hospedero y la misma cepa de *Beauveria*.

Tomando en cuenta los tres bioensayos podemos decir que la cepa 114 de *B. bassiana* presenta mortalidades entre el 95%.

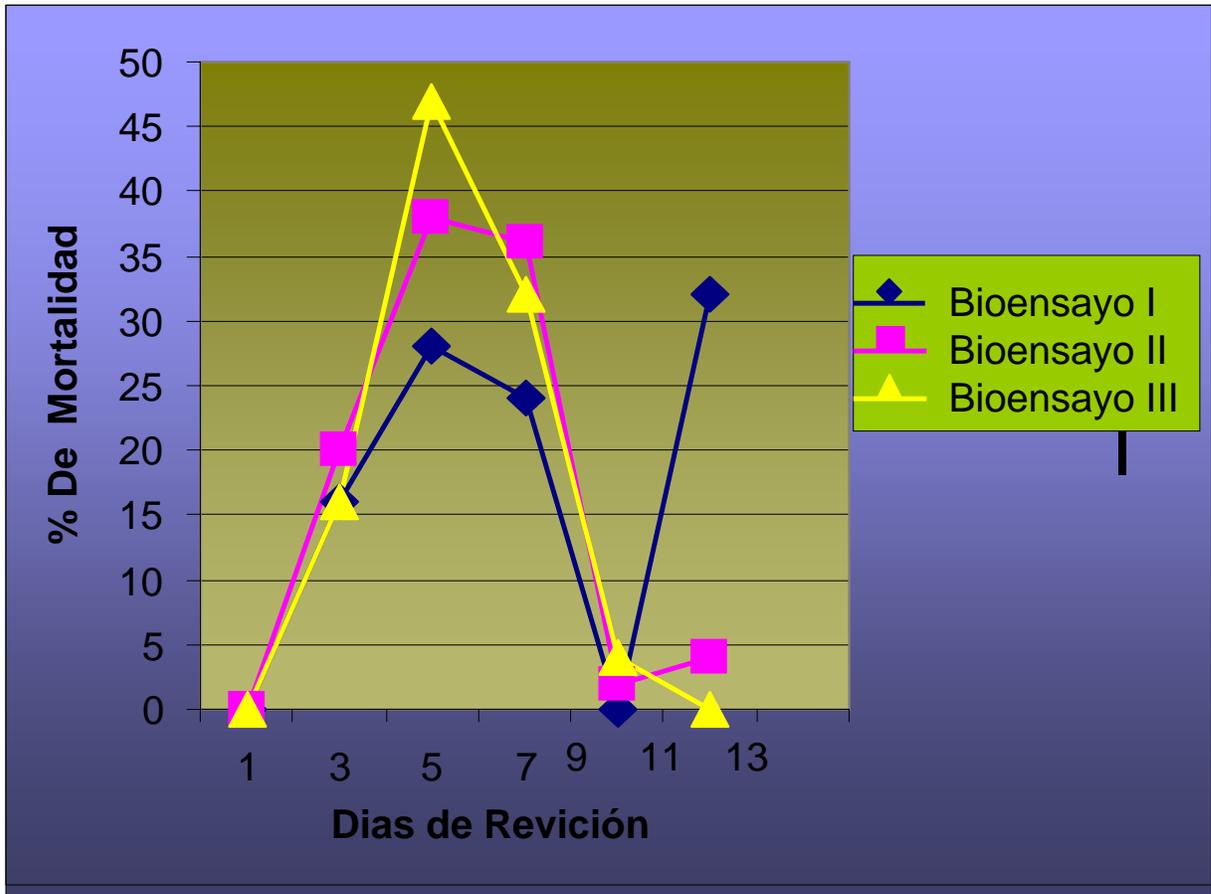


Gráfico No. 1 Patogenicidad de la cepa 114 de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Boophilus microplus* UNAN-León, 2007.

5.2 Porcentaje de esporulación

En la grafica número dos, se muestran los porcentajes de esporulación de las garrapatas muertas. Pueden observar que el biensayo número 3 presentó los más altos porcentajes de esporulación con un 40%, en cambio en el biensayo 1 y 2 la esporulación se encuentra entre 32 y 38%. Sabemos que la esporulación de estas garrapatas es la evidencia de la mortalidad del agente causal, pero que esta esporulación esta afectada principalmente por temperatura y humedad relativa lo que puede influir en los porcentajes de esporulación tanto en el campo como en el laboratorio. Los datos obtenidos son muy alentadores ya que en los trabajos realizados por Quiroz, (1994) con picudo de plátanos se lograron porcentajes no mayores del 30% de esporulación. Sin embargo para que un biensayo de patogenicidad se ha considerado satisfactorio la esporulación aceptada debe ser de 20% de los insectos expuesto al inóculo (Leucona, 1995).

Considerando los parámetros de patogenicidad los resultados obtenidos nos indican que la cepa 114 de *B. bassiana*, es altamente patogénica a *Boophilus microplus* con una mortalidad promedio de 95%, y una respuesta de esporulación promedio de 40%, resultados aceptables para que la cepa 114 sea considerada para la utilización en el control de *Boophilus microplus* en el campo.

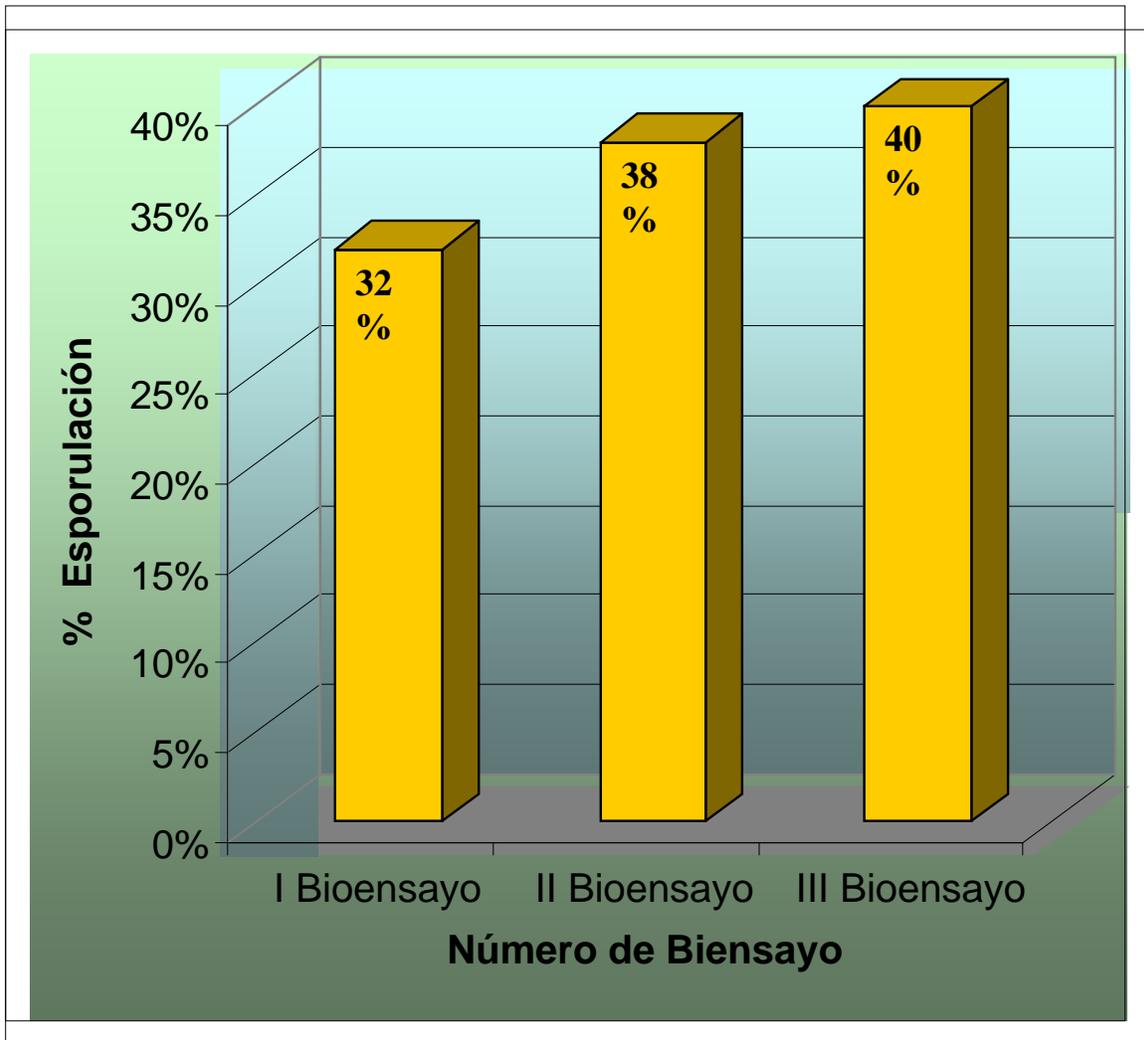


Gráfico No. 2 Porcentaje de esporulación de la cepa 114 de *B. bassiana* sobre adultos de *Boophilus microplus*, UNAN-León, 2007

5.3. Porcentaje de contaminación en platos y bolsas

En la gráfica tres, podemos observar que los principales contaminantes en platos fueron *Aspergillus* con un 45%, Bacteria con un 5% para un total de 50% de contaminación en platos, en bolsas obtuvimos un 29% de contaminación de *Trichoderma*. Según Alves (1986), los parámetros permisibles de contaminación en los laboratorios es de 20% por lo que nuestros porcentajes de contaminación sobrepasan estos niveles.

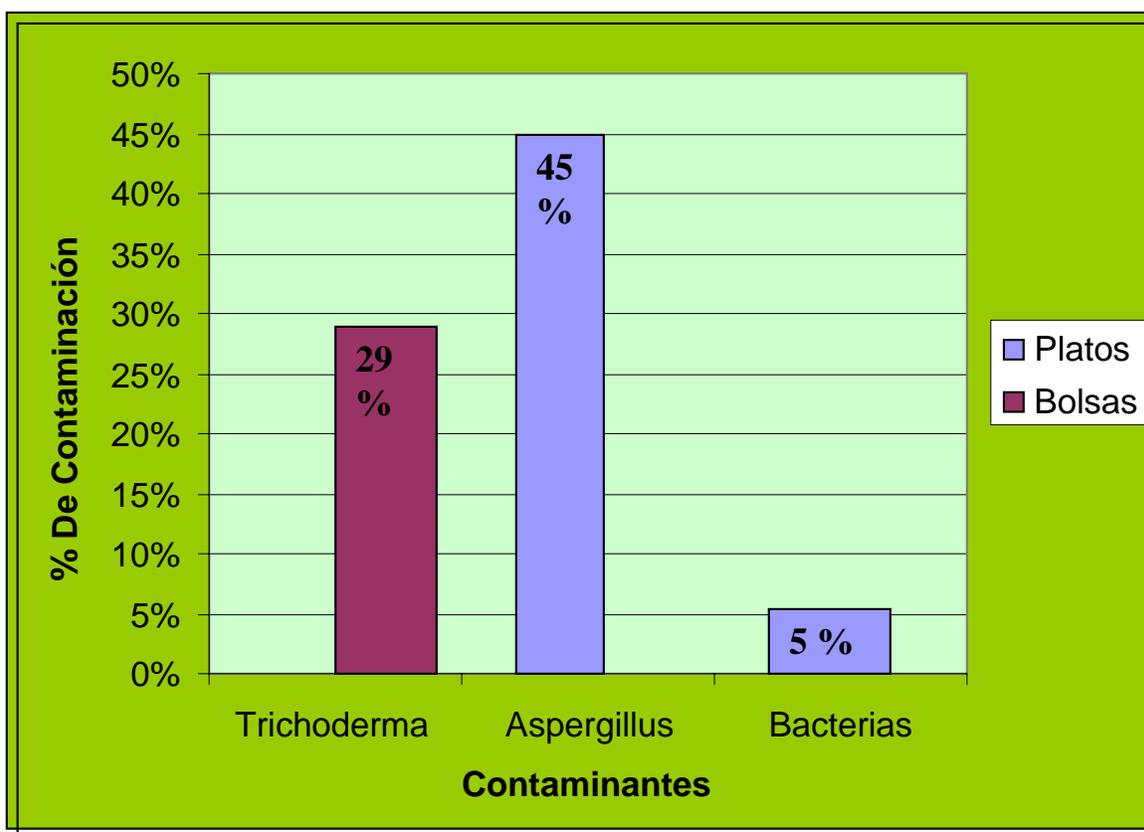


Gráfico No. 3 Contaminantes presentes en la producción del hongo *Beauveria bassiana* en platos y bolsas, UNAN-León, 2007

5.4. Niveles de infección antes de la aplicación

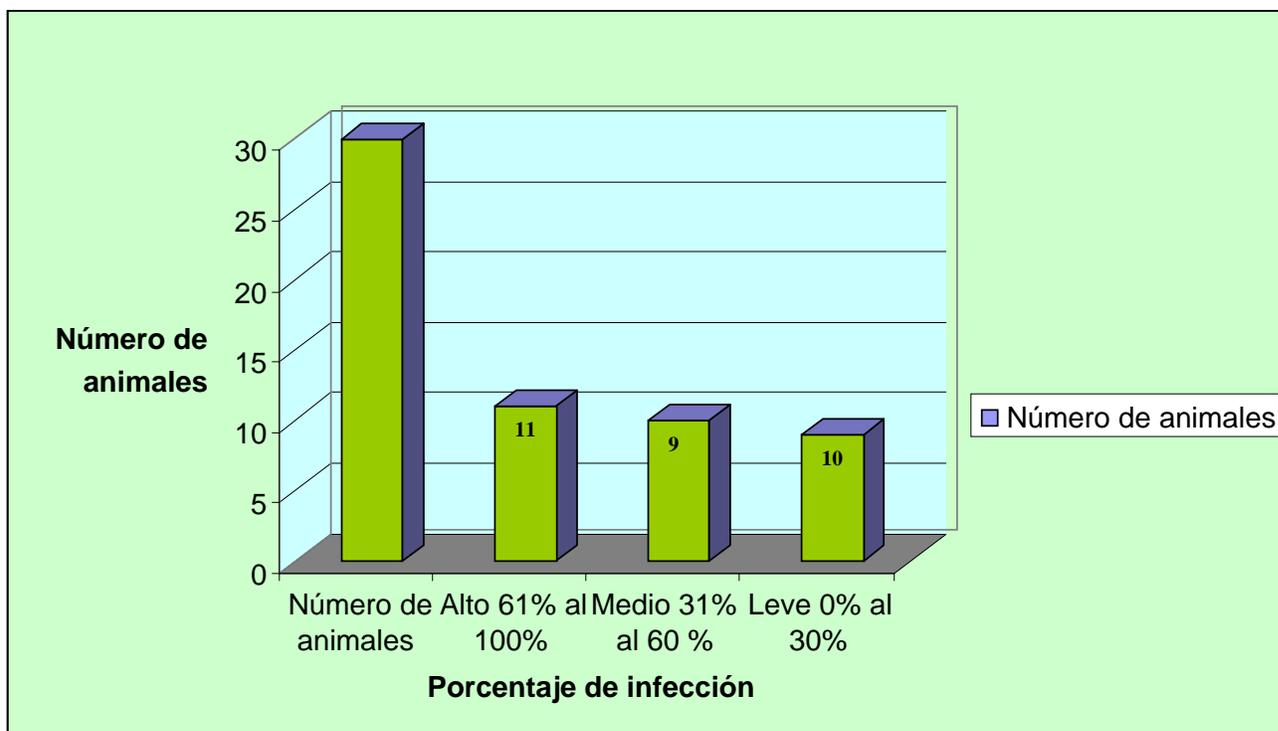


Gráfico No. 4 Porcentaje de infección de *Boophilus microplus*, antes de la aplicación de *B. bassiana* en la finca la Esperanza, Mina el Limón, 2007.

En el gráfico 4, se muestra el porcentaje de infestación y la división de los grupos de animales. El primer muestreo se realizó el 22 de julio de 2007 y se obtuvieron los siguientes datos:
Infestación leve 9 animales, Infestación media 10 animales, Infestación alta 11 animales.

5.5. Niveles de infección después de la primera aplicación

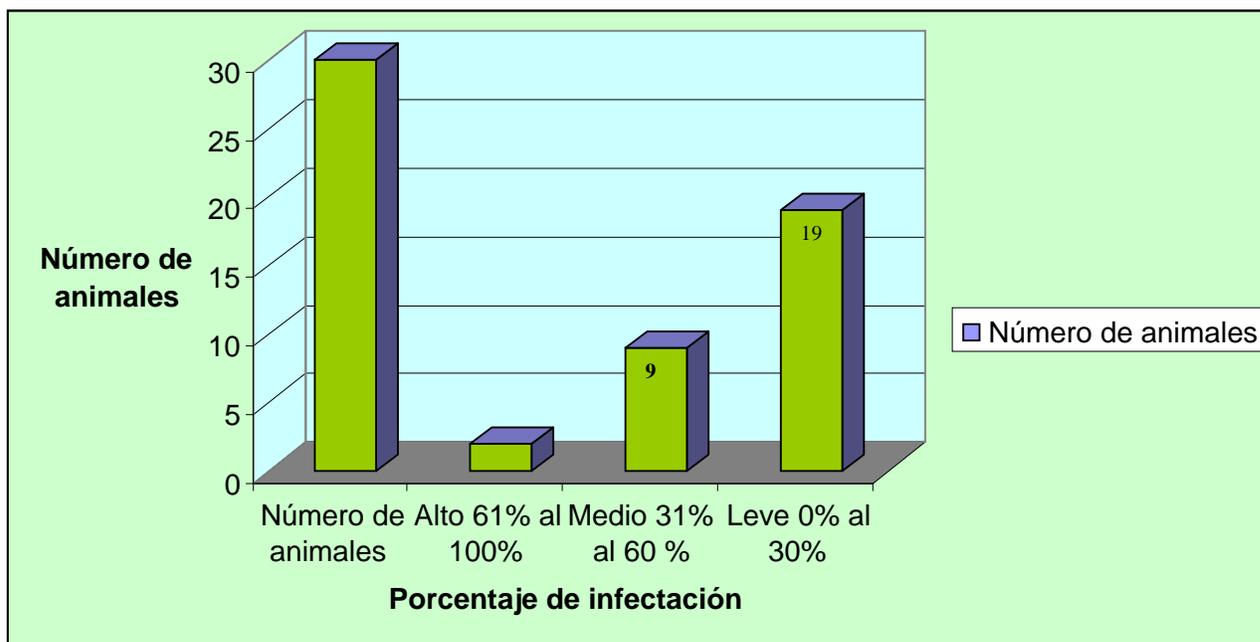


Gráfico No.5 Porcentaje de infección de *Boophilus microplus*, después de la aplicación de *B. bassiana*, en la finca La Esperanza, Mina el Limón, 2007.

En el gráfico 5 muestra el primer recuento después de la aplicación del hongo *Beauveria bassiana*, en el cual se obtuvieron los siguientes niveles de infestación: Infestación Leve 19 animales, Infestación media 9, Infestación alta 2.

Para la fecha del 31 de Julio de 2007, nueve días después de la primera aplicación el promedio poblacional de infestación alta se reduce de 11 a 2 animales.

Según Alves en (1986) y Quiroz y Jiménez en (1984), los datos de mortalidad en campo fueron bajos ya que ellos en estudios realizados, en picudo de plátanos, lograron mortalidades hasta de un 80%. Sin embargo estos mismos autores señalan que para lograr altas mortalidades en campo, el hongo debe tener las condiciones mínima de temperatura, humedad, cantidad de inóculo, susceptibilidad del hospedero.

En nuestra evaluación, las condiciones ambientales como la humedad y la temperatura, influyeron mucho en la eficacia de la aplicación, ya que evaluamos en período de lluvia.

5.6. Niveles de infección después de la segunda aplicación

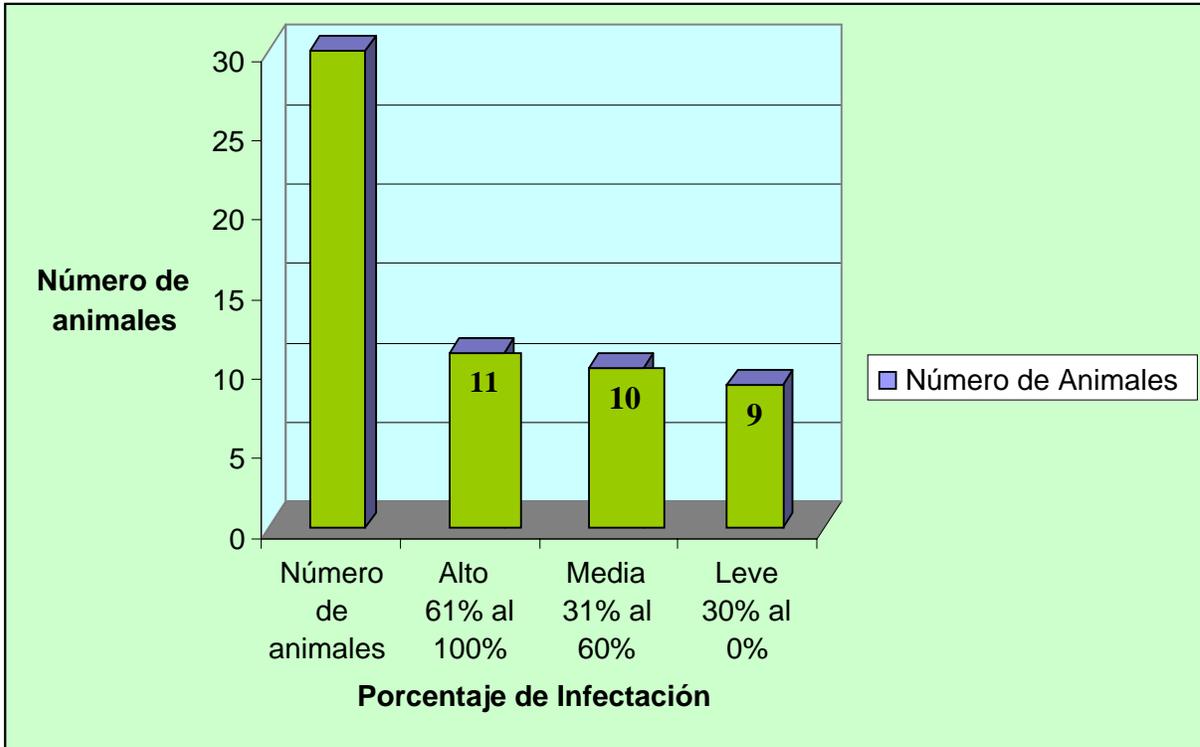


Gráfico No.6 Porcentaje de infección de *Boophilus microplus*, después de la segunda aplicación de *B. bassiana*, en la finca la Esperanza, Mina el Limón, 2007.

En el gráfico 6, se muestra el segundo recuento después de la aplicación del hongo *B. bassiana* en el cual se obtuvieron los siguientes niveles de infestación: Infestación leve 9 animales, Infestación Media 10 animales, Infestación Alta 11 animales.

En esta gráfica podemos observar, que el índice poblacional de *Boophilus microplus*, llegó a ser igual que al primer muestreo, en el inicio del estudio, esto es debido que el ganado siempre circula en los mismos potreros, por lo que tiende a tener infestaciones constantes del parásito.

	Antes de la primera aplicación	Después de la primera aplicación	Después de la segunda aplicación
Nivel alto 61% al 100%	11	9	10
Nivel medio 31% al 61%	2	9	19
Nivel bajo 0% al 31%	11	10	9

Tabla 1. Niveles de infestación antes y después de las aplicaciones de *B. bassiana* en el campo.

En la siguiente tabla se puede observar, como se encontraban los niveles de infestaciones, del grupo de vacuno del estudio, antes y después de las aplicaciones de *B. bassiana*.

En el primer recuento se encontraban, 11 animales con una infestación alta, después de la primera aplicación bajo a 10 y en la segunda a 9.

En el primer recuento habían, 2 animales con una infestación media, después de la primera habían 9, y en la segunda 19.

En el primer recuento habían, 11 animales en la infestación leve después de la primera aplicación 10 animales, y en la segunda 9.

Se puede observar en la tabla, que los datos antes y después de la aplicación son iguales, esto se debe a que las aplicaciones se realizaron cada 8 días, por lo que no se altero significativamente su ciclo biológico y siguieron reproduciéndose con facilidad.

VI. Conclusiones

1. La cepa 114 *Beauveria bassiana*, es patogénica sobre *Boophilus microplus spp.*, causando mortalidades de 94.6%.
2. Las mortalidades de *Boophilus microplus* en condiciones de laboratorio iniciaron al tercer día, llegando al séptimo día obtenemos un 94.6 %.
3. La cepa 114 *Beauveria bassiana*, evaluada en campo logra porcentajes de mortalidad hasta del 50%.
4. Las mayores mortalidades de *Boophilus microplus* en campo se observaron a los 8 días después de la aplicación.

VII. Recomendaciones

1. Realizar estudios de *B. bassiana* sobre *B. microplus* en sus diferentes estadios, para así determinar en cual de ellos es más susceptible, y llegar a obtener mejores resultados en el control.
2. Para reducir las poblaciones de garrapatas *B. microplus*, a través de la utilización de hongos entomopatógenos es necesario conocer el ciclo de vida de la garrapata para evitar re-infestaciones.
3. Se recomienda la reactivación de la cepa 114 *B. bassiana* sobre las ninfas de garrapatas, ya que durante el estudio de laboratorio sobre esta hubo mayor esporulación.
4. Al momento de la aplicación de *Beauveria bassiana*, se debe de tomar en cuenta, las condiciones ambientales, tiempo de aplicación, método de aplicación, ciclo de vida del insecto, para que favorezca las condiciones de epizootias del hongo.
5. Para obtener mejores resultados en las reducciones de poblaciones de garrapatas, hay que hacer aplicaciones en las praderas por donde circula el ganado para evitar reinfestaciones por *Boophilus microplus*.
6. Las aplicaciones seriadas del hongo entomopatógeno garantizan una mejor regulación, de las poblaciones del parasito *Boophilus microplus*.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Alatorre, R Hongo entomopatógenos, Memoria XI Congreso Nacional de Control Biológico Guanajuato, Mexico 2000 pag. 134
2. Alves S.B. 1986 Control Microbiano de Insectos Editore Manole LTDA, Sao Paulo Brasil 1993. pag.125
3. Barrientos L. 2002, Uso de hongos entomopatógenos en el control de plagas en el campo, comercialización, uso actual y futuros de hongos entomopatogenos, curso de patología de insectos, ciudad victoria Tamaulipas, Mexico,.
4. Balladares César A, 1983, Dinámica de la garrapata en Nicaragua, Ministerio de Desarrollo Agropecuario y Reforma Agraria, Centro Nacional de Diagnostico e Investigaciones veterinaria tomo 1. Managua, Nicaragua julio 19,
5. Control de garrapatas del ganado vacuno (publicación de Cooper) 1998. pag. 39.
6. Gomez M. 1996, Evaluación de la patogenicidad de 10 cepas de *Beauveria basianna* y 10 cepas de *Metarrizum anisopliae* sobre el picudo de algodón. León, Nicaragua. Tesis UNAN- León, 1996.
7. Jiménez C. 1994, Uso de hongo entomopatógeno para le manejo de picudo negro del platano (*Cosmopolites sordidus*) editado por CATIE – INTA / MIP (NORADASDI). Informe final del proyecto hongo entomopatogeno, Centro Nacional de Diagnostico Fitosanitario, MAG. 1991-94. Managua, Nicaragua.

8. Lecuona R. 1995, Microorganismo patógenos empleados en el control microbiano de insecto plagas.

9. Lazo Marlon, 1999, Uso de hongos entomopatógenos en el control de ectoparásitos. <http://www.monografias.com/trabajos29/hongos-entomopatogenos/hongos-entomopatogenos.shtml>. consultado 16-5-2006

10. Manual para personal auxiliar de sanidad animal 2003, Pág. 116, 141, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

11. Manual práctico del hacendado, BAYER 2002. Pág. 74, 80

12. Manuel Quinteros, 2005 Control integrado contra la garrapata (*B. microplus*). <http://www.monografias.com/trabajos33/control-garrapata/control-garrapata.shtml>. consultado 21-03-2006.

13. Melina Bustamante, Nilda Castro, Iveth Chávez, Kleber Del Aguila, Julia Castro, EVALUACION DE LA PATOGENICIDAD DE *VERTICILLUM LECANII* Y *BEAUVERIA BASSIANA* SOBRE *BOOPHILUS MICROPLUS* Laboratorio de Inmunología Parasitaria. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM jcastroh@unmsm.edu.pe

14. Moreno L. Espino. E. evaluación de la eficacia del control de *Beauveria basiana* (Balls) Viull en picudo negro de plátano *Cosmopolites sordidus* (Germar), (Coleoptera cucurlionidae). Tesis de Ingeniería Agroecología. 2002- 2003.

15. Publicación de Cooper (1998). Pag. 4, 5, 6, 8, 10.

16. Quiroz.I et. Al. Disponibilidad de aislados patogénicos de hongos entomopatógenos para el manejo de plagas insectiles de importancia en la región. Editado por CATIE-INTA/ MIP. (NORAD-ASDI). Informe final del proyecto hongo entomopatógeno Centro Nacional de Diagnostico Fitosanitario, MAG. 1991-1994 Managua Nicaragua 1994

17. Rosa Rozas Álvarez Arnaldo Gonzáles Pacheco Carlos Tello Inga, EFECTO DE TRES CEPAS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE *BOOPHILUS MICROPLUS* EN BOVINOS, Servicio Nacional de Sanidad Agraria – SENASA. rrozas@senasa.gob.pe

18. Rosas J. Hongo entomopatógeno. Curso internacional de patología de insecto, Ciudad Victoria, Tamaulipas, 2000.

19. Serrano y Zambrana S.A: (2000). División agropecuaria.

20. Taller de producción y uso de hongos entomopatógenos (UNA-CATIE/INTA-FAITAN)

21. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, Facultad de Veterinaria. <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=SIBURFV.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=002793>

22. Vuill. 2005, Evaluación de la eficacia del sistema de producción líquida para la obtención de blastosporas, de *Beauveria bassiana* (Balls). Campus Agropecuario

2005. Previo para optar al título de Ingeniero en Agroecología Tropical. Leon, Nicaragua, Noviembre 2005.

ANEXOS



Anexo 1. Esporulaci3n del hongo *Beauveria bassiana* sobre *Bophilus microplus*



Anexo 2. *Bophilus microplus* muerto con síntoma de esporulación 12 días después de infestación



Anexo 3. Crecimiento de *Beauveria bassiana* sobre medio de cultivo PDA con contaminación de *Trichoderma*



Anexo 4. Invasión total de Beauveria b. sobre *Bophilus microplus*.



Anexo 5. Bovino infestado por *Bophilus microplus* sobre una de las zonas ecológicas específicas.



Anexo 6. Animal infestado con *Bophilus microplus* en su ingle con su pecho.