



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

SEDE JUIGALPA

## Trabajo de Graduación

Control microbiano de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) del ganado bovino, con hongos entomopatógenos en condiciones de laboratorio

AUTOR

Br. Juan José Oporta López

ASESORES

PhD. Arnulfo José Monzón Centeno

MSc. Víctor Ramón Monzón Ruíz

Juigalpa, Chontales-Nicaragua

Mayo-2017



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
SEDE JUIGALPA

Trabajo de Graduación

Control microbiano de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) del ganado bovino, con hongos entomopatógenos en condiciones de laboratorio

AUTOR

Br. Juan José Oporta López

ASESORES

PhD. Arnulfo José Monzón Centeno,

MSc. Víctor Ramón Monzón Ruíz

*Presentado a la consideración del Honorable Tribunal Examinador como requisito parcial para optar al grado de Ingeniero Agrónomo*

Juigalpa, Chontales

Mayo-2017

## ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	6
2.1. Objetivo general.....	6
2.2. Objetivos específicos.....	6
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1. Ubicación geográfica del estudio.....	7
3.2. Diseño metodológico.....	7
3.3. Manejo del bioensayo.....	7
3.3.1. Toma de muestras de garrapatas para identificación taxonómica de <i>R. microplus</i> .....	7
3.3.2. Obtención de los hongos.....	7
3.3.3. Bioensayo preliminar para determinar efecto de los hongos entomopatógenos sobre <i>R. microplus</i> .....	8
3.3.4. Aislamiento de los hongos entomopatógenos, pase y preservación en cultivo puro.....	8
3.3.5. Reproducción del inóculo.....	8
3.4. Establecimiento de bioensayos.....	9
3.4.1. Colecta de garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i> para bioensayos.....	9
3.4.2. Preparación de las muestras de garrapatas para posterior inoculación.....	10
3.4.3. Preparación del hongo para la inoculación.....	10
3.4.4. Inoculación de garrapatas.....	11
3.5. Variables evaluadas.....	11
3.5.1. Viabilidad de los conidios de los hongos entomopatógenos en medio agar-agua 2%.....	11
3.5.2. Caracterización macroscópica y microscópica de las colonias y conidios de los hongos entomopatógenos, en medio solido PDA.....	12
3.5.3. Mortalidad de teleoginas de <i>R. microplus</i> .....	12
3.5.4. Porcentaje de parasitismo producido por los hongos entomopatógenos a las teleoginas de <i>R. microplus</i> .....	12
3.5.5. Recolección de datos.....	13
3.5.6. Análisis de datos.....	13

IV.	RESULTADOS Y DISCUSION .....	14
4.1.	Caracterización de cepas de, <i>M. anisopliae</i> , <i>C. bassiana</i> e <i>I. fumosorosea</i> .....	14
4.1.1.	<i>M. anisopliae</i> cepa monte rosa .....	14
4.1.2.	<i>C. bassiana</i> cepa 114.....	14
4.1.3.	<i>I. fumosorosea</i> MB-2015.....	14
4.2.	Viabilidad de los conidios .....	15
4.3.	Mortalidad de <i>R. microplus</i> con diferentes concentraciones de conidios de hongos entomopatógenos.....	17
4.3.1.	Mortalidad de <i>R. microplus</i> causada por <i>M. anisopliae</i> .....	17
4.3.2.	Mortalidad de <i>R. microplus</i> causada por <i>C. bassiana</i> .....	18
4.3.3.	Mortalidad de <i>R. microplus</i> causada por <i>I. fumosorosea</i> .....	19
4.4.	Parasitismo de <i>M. anisopliae</i> en teleoginas de <i>R. microplus</i> .....	20
4.4.1.	Parasitismo de <i>C. bassiana</i> en teleoginas de <i>R. microplus</i> .....	23
4.4.2.	Parasitismo en teleoginas de <i>R. microplus</i> por <i>I. fumosorosea</i> .....	24
4.5.	Concentración letal media (CL50) .....	26
4.5.1.	<i>M. anisopliae</i> cepa monte rosa .....	26
4.5.2.	<i>C. bassiana</i> cepa 114.....	27
4.5.3.	<i>I. fumosorosea</i> cepa MB-2015 .....	27
4.6.	Tiempo letal medio (TL <sub>50</sub> ).....	28
4.6.1.	<i>M. anisopliae</i> cepa monte rosa .....	28
4.6.2.	<i>C. bassiana</i> cepa 114.....	28
4.6.3.	<i>I. fumosorosea</i> cepa MB-2015 .....	28
V.	CONCLUSIONES.....	29
VI.	RECOMENDACIONES .....	30
VII.	LITERATURA CITADA.....	31
VIII.	ANEXOS.....	39

## DEDICATORIA

El concluir este trabajo de investigación, se lo dedico a mí señor Jesucristo, el que ha estado conmigo en todo momento de mi vida.

A mis padres René Oporta y Guillermina López, por su dedicación, apoyo e incansable amor. Gracias por ser mis padres.

A mis abuelos maternos Juan López y Rosa Orozco

A mis abuelos paternos José Oporta† y Estebana García †

A mis hermanos Jeaneth, René, Estebana y Guillermina.

A mis sobrinos Derrick, Heydam y Derenisse.

A mis tías Judith y Nancy.

*Juan José Oporta López*

## AGRADECIMIENTOS

Por cuanto la búsqueda de la verdad de las cosas, a través del método científico es una tarea ardua y de mucha dedicación, en la cual se necesita de la ayuda de muchas personas. Es obligatorio hacer frente a los obstáculos que aparecen en el camino, hay que plantarse firme, como un árbol, hasta llegar al objetivo planteado, esto se logra con valentía, humildad y sobre todo las ganas de ver cambios en la producción de nuestros productores agropecuarios. Por ello quiero agradecer a quienes colaboraron de una u otra forma a concluir esta bella y noble profesión, a los que estuvieron para animarme, a no desistir y concluir la jornada.

Ante todo a Dios, por la vida, la sabiduría, la persistencia, la paz y su inmenso amor. A mi papá, por su esfuerzo, por el ejemplo y apoyo que me ha dado siempre. A mi mamá por ser ejemplo, en seguir adelante para lograr lo que queremos, por su esfuerzo en guiarme y ayudarme a cumplir las metas. Por los principios y valores que inculcó y por demostrarme que el conocimiento que el ser humano construye es vital para ayudar a la sociedad. A mis hermanos por ser mi todo, por compartir cada momento. A mis abuelitos por sus buenos consejos, a mi tía Judith por su apoyo sin condiciones, su amistad, consejos, e instarme a seguir siempre adelante, a mis tías Nancy, Rosa y Elba por su buena amistad y consejos.

A mis asesores:

Al PhD. Arnulfo Monzón Centeno, de la Facultad de Agronomía (FAGRO) por la oportunidad que me brindó de realizar este trabajo bajo su asesoría, por compartir sus conocimientos e instarme con su ejemplo, por su amistad, paciencia, consejos, ideas y correcciones para la realización de la tesis. Al Ing. MSc, Víctor Monzón Ruiz de la FAGRO por su apoyo en la realización del experimento, las recomendaciones y la confianza brindada.

Al PhD. Cesar Mora Hernández del Laboratorio de Parasitología Veterinaria, de la Facultad de Ciencia Animal (FACA) por el apoyo, revisión de bibliografía y sus buenos consejos e instarme a seguir adelante.

Al personal de investigación del laboratorio de hongos entomopatógenos Ing. Markelyn Rodríguez por su amistad, apoyo, recomendaciones y hospitalidad durante mi estancia en Managua, al Ing. Santos Romero por su valioso apoyo, amistad y recomendaciones durante todo el tiempo de la investigación, a la MSc. Rosario Chavarría por el apoyo y buenos consejos.

Al Prof. PhD. Ulises Blandón Díaz, del laboratorio de microbiología por su amistad, sus buenos consejos y recomendaciones.

Al Prof. MSc Carlos Ruiz Fonseca de la FACA por su apoyo y recomendaciones.

Al Ing. Jorge Sobalvarro de la UNA sede Juigalpa por apoyarme cuando le comenté la temática de la investigación y contactar el medio para realizarla.

A la Lic. Guadalupe Urbina responsable de la biblioteca de la UNA Juigalpa, por su buena amistad, apoyo en la recopilación de información y su consejo a seguir siempre adelante.

A la Prof. Lic. Tania García por sus recomendaciones y consejos.

A la Prof. Ing. María Nelly Salazar por su amistad, apoyo y recomendación.

A la Prof. Lic. Rosa Nelly Acuña López por su amistad, consejos, compartir sus conocimientos y por todo el apoyo brindado.

Al Prof. Ing. Luis Manuel Luna lazo, por su amistad, su enseñanza, compartir sus conocimientos y sus buenos consejos.

Al Prof. Ing. José Antonio Vargas, por apoyo y recomendaciones.

Al Prof. Ing. Aníbal Montiel, por el apoyo brindado.

A los docentes: PhD. Oscar Gómez, MSc, Luis Balmaceda, PhD, Víctor Aguilar Bustamante, Ing. Norlan Méndez, MSc. Marvin Fornos, MSC. Luis Hernández, MSc. Fernando Vivas, MSc. Arsenio Sáenz, MSc. Rigoberto López Valdivia, Ing. José Antonio Vargas, Ing. Fabiola Ríos Fornos, MSc. Eddy bejarano, por sus enseñanzas, compartir sus experiencias y consejos.

A los amigos; Estela Mena, Kendy Vivas, Lesby Mejía, María Rodríguez, Franklin Sequeira, Joel Oporta, Jaminton Solano, Geovanny Calero, Jilson García, Jeaneth Cienfuegos, Ana Miranda, Dania López, Jader Aragón, Ely Castro. Gracias por el apoyo y ayudarme de una u otra forma, con su buena amistad y sus consejos.

A mis primos Leopoldo, Joheyling y Nathalie por su amistad y apoyo.

A los amigos de la UNA-Juigalpa gracias por su apoyo, Ing. Jackie, Lic. Vilma, Ing. Yulissa Sandoval. A los amigos que cursaron conmigo estos años en la UNA-Juigalpa, Delwing Ruiz, Lisseth Pérez, Alberto Tablada, Amara Zoan, Liliveth Castilla, Maximiliano Miranda, Yasser campos, Dennis Vargas, Bismarck Pérez, Hamerling Picado

Al Ing. Jofiel Jirón por compartir sus conocimientos, por su apoyo y consejos.

Al Ing. Juan Muñoz Gross por su amistad y buenos consejos.

Al Ing. César Mendoza por su buena amistad y apoyo brindado

A todas las personas que me apoyaron dándome animo a seguir siempre adelante.

*Juan José Oporta López*

*“Nomina si nescis, perit et cognitio rerum”*. (Si ignoras el nombre de las cosas, desaparece también lo que sabes de ellas) Carl von Linneo, 1755

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURAS</b>	<b>PÁGINA</b>
Figura 1. Germinación de conidios	16
Figura 2. Especímenes muertos de adultos de <i>R. microplus</i> colonizados por <i>M. anisopliae</i>	21
Figura 3. Posturas y Teleoginas de <i>R. microplus</i> colonizadas por <i>C. bassiana</i>	24
Figura 4. Posturas y Teleoginas de <i>R. microplus</i> parasitadas por <i>I. fumosorosea</i>	26

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1. Placas estigmáticas (espiráculos) de <i>R. microplus</i>	39
2. Análisis de varianza porcentaje de germinación <i>M. anisopliae</i>	39
3. Análisis de varianza porcentaje de germinación <i>C. bassiana</i>	39
4. Análisis de varianza porcentaje de germinación <i>I. fumosorosea</i>	40
5. Análisis de varianza % mortalidad Abbott <i>M. anisopliae</i>	40
6. Análisis de varianza % mortalidad Abbott <i>C. bassiana</i>	41
7. Análisis de varianza % de mortalidad Abbott <i>I. fumosorosea</i>	41
8. Análisis de varianza de garrapatas parasitadas por <i>M. anisopliae</i>	42
9. Análisis de varianza de garrapatas parasitadas por <i>C. bassiana</i>	42
10. Análisis de varianza de garrapatas parasitadas por <i>I. fumosorosea</i>	42
12. Clasificación taxonómica de <i>Rhipicephalus microplus</i>	43
13. Clasificación taxonómica de los hongos entomopatógenos	43

## RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el potencial de hongos entomopatógenos Hypocreales, como agentes de control microbiano de la garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus microplus*, se realizó un estudio para evaluar el efecto sobre la mortalidad y parasitismo en teleoginas de *R. microplus*, bajo condiciones de laboratorio. Los hongos entomopatógenos evaluados fueron: *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* e *Isaria fumosorosea*. Primeramente se estableció un bioensayo preliminar, usando una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml, inoculando las garrapatas mediante el método de inmersión. A partir de las teleoginas que resultaron parasitadas, se aisló el hongo a ser utilizado en los bioensayos posteriores, el que fue caracterizado mediante descriptores morfológicos. Para la evaluación de los tratamientos, se estableció un diseño completamente al azar con 6 tratamientos y 5 repeticiones. Los tratamientos evaluados consistieron en seis concentraciones de conidios/ml  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$ . Cada unidad experimental estaba conformada por diez teleoginas. Las teleoginas se obtuvieron de ganado bovino infestado naturalmente. El muestreo se realizó cada 24 horas después de realizada la inoculación, registrando el número de teleoginas vivas, muertas, ovipositando y las que presentaron signos de micosis. Además se registró el porcentaje de parasitismo, concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>). La viabilidad de conidios se cuantificó de las 18 a las 22 horas después del tratamiento. La mortalidad se corrigió mediante la fórmula de Abbott, se realizó análisis de varianza para comparar la mortalidad y parasitismo ocurrido en los tratamientos. La CL<sub>50</sub> y el TL<sub>50</sub> se obtuvieron mediante análisis probit. En conclusión, el mayor porcentaje de mortalidad de teleoginas se obtuvo con *M. anisopliae* y el menor con *I. fumosorosea*. El mayor porcentaje de parasitismo se presentó en *M. anisopliae* y el más bajo se encontró en *C. bassiana*. La CL<sub>50</sub> más baja se encontró en *M. anisopliae* y la más alta en *I. fumosorosea*, seguida por *C. bassiana*. *I. fumosorosea* presentó un TL<sub>50</sub> mayor a *M. anisopliae*, pero menor a *C. bassiana*. En cuanto a viabilidad el mayor porcentaje se encontró en *I. fumosorosea*. Los resultados de este estudio determinaron que *M. anisopliae* presentó mejores características como agente de control microbiano a teleoginas de *R. microplus*.

**Palabras claves:** mortalidad, parasitismo, CL<sub>50</sub>, TL<sub>50</sub>, Hypocreales.

## ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effect of entomopathogenic fungi on mortality and parasitism in adults of *R. microplus*, under laboratory conditions, to contribute to development of management alternatives of this pest. The entomopathogenic fungi evaluated were: *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* and *Isaria fumosorosea*. A preliminary bioassay was established, using a concentration of  $1 \times 10^8$  conidia/ml, by inoculating ticks by immersion method. Fungi used in experiment was taken from the adults which were parasitized in preliminary bioassay and were characterized through morphological descriptors. Six treatments consisting of six concentrations of conidia/ml  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  and  $1 \times 10^8$  were evaluated, which were established in a random design with 5 replications. Each experimental unit consisted of ten adults. Adults ticks *R. microplus* used in the experiment were obtained from cattle naturally infested. The sampling was carried out every 24 hours starting after inoculation. Number of ticks alive, dead, ovipositing females and number of those that show signs of mycosis was registered. In addition, the percentage of parasitism, the Median Lethal concentration (LC<sub>50</sub>) and Median Lethal Time (LT<sub>50</sub>) was also registered. The viability of conidia was quantified since 18 to 22 hours after the treatment. Mortality was corrected using the Abbott formula, and analysis of variance was conducted to compare mortality and parasitism. The lowest Median Lethal concentration and the Median Lethal Time were obtained by probit analysis. In conclusion, the highest percentage of mortality was obtained with *M. anisopliae* and the lowest with *I. fumosorosea*. The highest percentage of parasitism was observed in *M. anisopliae*, followed by *I. fumosorosea* and the lowest was found in *C. bassiana*. The lowest Median Lethal Time was registered in *M. anisopliae* and the lowest in *C. bassiana*. In terms of conidia viability, the highest percentage was found in *I. fumosorosea*. The results of this study determined *M. anisopliae* presented best features as agent of microbial control to *R. microplus* adults.

**Key words:** mortality, parasitism, LC<sub>50</sub>, LT<sub>50</sub>, Hypocreales.

## I. INTRODUCCIÓN

La ganadería definida como la crianza de animales con el propósito de obtener un aprovechamiento de los mismos (Encarta, 2009), inició a finales del pleistoceno con el proceso de domesticación, mediante la expansión localizada de las poblaciones humanas (FAO, 2010), entre los beneficios obtenidos de esta, destacan la carne, leche, tracción y transporte, huevos, piel y compañía (Avelares *et al.*, 2003). El 70% de toda la tierra agrícola del mundo, está dedicada a la producción de ganado (Beeby, 2010). Existen varios tipos de ganado que son útiles al ser humano, tales como el bovino, porcino, equino, ovino y aviar.

De las diferentes especies de ganado que el hombre explota, el bovino es la más importante en términos económicos (Lira, 2010), ya que convierte el pasto y/o forraje en energía, grasa, carne y leche (Elsik *et al.*, 2009). Existen más de 1,300 millones de cabezas alrededor del mundo, contribuyendo en la producción económica (FAO, 2010) y en el sustento de casi 6.6 mil millones de seres humanos (Elsik *et al.*, 2009). Nicaragua es un país eminentemente agropecuario (MAGFOR, 2009). El sector pecuario ha crecido de manera sostenida en los últimos 15 años, a un promedio anual de 4.7%, destacándose el crecimiento del ganado vacuno (Cordón, 2012), este representa el 67% de la producción pecuaria (FUNICA, 2012).

La zona de mayor concentración ganadera se ubica en los departamentos de Boaco, Chontales, Matagalpa, Jinotega y las Regiones Autónomas del Atlántico (FAO, 2012; FUNICA, 2012; IICA, 2004). La producción lechera es una actividad importante para la economía en general y para la ocupación del territorio y los ingresos rurales en Nicaragua. La producción del año 2010 fue de unos 710 millones de litros, el consumo interno anual de productos lácteos del país se ubicó en el orden de los 100 litros (de equivalente-leche) por persona (FAO, 2012).

El 20 % de la producción nacional de leche se obtiene en el departamento de Chontales, donde además se elabora al menos 30% de derivados lácteos como el queso, quesillo y yogurt (Sequeira, 2016). Las condiciones sanitarias, son la principal causa de la baja productividad y de pérdidas en la producción bovina nicaragüense, especialmente la presencia de parásitos externos e internos (Cordón, 2012), interfieren en la productividad y rentabilidad de las explotaciones ganaderas, reduciendo la capacidad de los pequeños productores de salir de la pobreza (FAO, 2009). Entre los ectoparásitos sobresalen las moscas paletteras, tórsalos y garrapatas, siendo estas últimas las más difíciles de controlar (Almada, 2015; FAO, 2003).

Las garrapatas son ectoparásitos obligados, su alimentación es exclusivamente hematófaga sea cual fuere la familia, el género o la especie, en animales de sangre fría como de sangre caliente (NCBI Taxonomy browser, 2015; Aiello, 2000; Quiroz, 1990; Núñez *et al.*, 1982). Se estima que el 80% del ganado bovino del mundo está infestado por este ectoparásito (Suarez *et al.*, 2007) del que se han reconocido 896 especies (Guglielmone *et al.*, 2010). El costo de control y las enfermedades que estas transmiten al ganado bovino, ha sido estimado entre \$ 13.9 y 18.7 billones de dólares anualmente (Burger *et al.*, 2014).

La especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari-Ixodidae) Canestrini, 1888 (Barker y Murell, 2008; Murell y Barker, 2003), conocida como la garrapata común del bovino, es sin duda la más dañina de las garrapatas y el más dañino de los ectoparásitos que afectan al ganado bovino, ya que provoca daños en la piel, anemias, baja condición física, alteraciones

reproductivas, decrecimiento en la producción de leche y carne, mortalidad de los animales y parálisis. Además es agente transmisor de hemoparásitos (*Babesia* sp y *Anaplasma marginale*) (Rodríguez *et al.*, 2014; Burger *et al.*, 2014; Cordón, 2012; Botello *et al.*, 2011; FAO, 2010; Suarez *et al.*, 2007; Mora, 1998; Nari, 1995). Un animal infestado con más de 30 *R. microplus* adultas, ya es perjudicado productivamente (Almada, 2015), no es raro encontrar animales parasitados por cientos e incluso miles de garrapatas (Manzano *et al.*, 2012).

El grado de infestación está en relación con las lluvias, las altas temperaturas y la carga animal, la fase parasitaria que cumple en el animal tiene una duración de 22 días aproximadamente y cada hembra oviposita alrededor de 4500 huevos, los que tardan en eclosionar como mínimo 20 días, así en el norte de Uruguay y Argentina es factible ver entre 2 y 3 generaciones de garrapatas al año, mientras que en México y América Central es común ver hasta 7 generaciones al año. El control parasitario es más complejo cuantas más generaciones de garrapatas hay en el año (Almada, 2015; Villar, 2012).

En Nicaragua se reportan 38 especies de garrapatas y *R. microplus* es una de las que mayor daño produce a la ganadería bovina (Cordón 2012). Esta garrapata se encuentra ampliamente distribuida en las zonas ganaderas de Boaco, Chontales, la zona del pacífico (Balladares, 1983) y la Región Autónoma Costa Caribe Norte (Alvarado y Dixon 2010). Las pérdidas en carne, se estiman de 15 a 40 kg de peso vivo de los animales, según grado de infestación por animal, en leche se calcula una merma de 0.3 litros/día por animal y en las pieles, estas disminuyen su valor hasta en un 90%. Hay cálculos de 0.6% de mortalidad por la transmisión de hemoparásitos (Cordón, 2012).

El método de control más utilizado actualmente para *R. microplus* es el químico. Entre las principales familias de garrapaticidas sintéticos se encuentran los organofosforados, piretroides, amidinas, fenilpirazolonas, carbamatos y lactonas macrocíclicas, los cuales tienen como efecto común en la garrapata, alterar la transmisión del impulso nervioso en la unión sináptica, mediante diferentes mecanismos de acción que afectan los neurotransmisores o los canales iónicos que intervienen en ella (Dominguez y Cruz, 2014; Díaz, 2012; Ojeda *et al.*, 2011), este método de control al ser único, se ha usado irracionalmente, lo que ha conllevado a que las garrapatas presenten resistencia generalizada a los acaricidas (Almada, 2015; Dominguez y Cruz, 2014; Díaz, 2012; Acosta *et al.*, 2007; Ruvalcaba, 2009; FAO, 2003).

Resistencia a los plaguicidas se define como la habilidad de una población de parásitos, para tolerar dosis de tóxicos que serían letales para la mayoría de individuos en una población normal (susceptible) de la misma especie. La resistencia ocurre cuando las mutaciones que se efectúan de manera natural, le permiten a una pequeña proporción de la población (alrededor de 1 en 1 000 000 de individuos) resistir y sobrevivir a los efectos de los productos químicos empleados como plaguicidas (Domínguez *et al.*, 2010; FAO, 2003).

Las poblaciones resistentes a más de un ingrediente activo son comunes en varias partes del mundo. En Brasil una cepa de *R. microplus* denominada Jaguar, es resistente a la cipermetrina, deltametrina, clorpirifos, mezcla de cipermetrina y clorpirifos, amitraz, fipronil, ivermectina, moxidectina, abamectina y finalmente fluzurón (Dominguez *et al.*, 2013). Según Sequeira (2016), en el departamento de Chontales, Nicaragua, los productores de bovino, expresan que hay un problema severo de garrapatas y que no hay producto que las controle.

Lazo y Mejía (2009) a través de la prueba de inmersión de teleoginas del subgénero *Boophilus*, en condiciones *in vitro*, provenientes de 4 municipios de Chontales, obtuvieron un control del 81% con amitraz y un 26% con deltametrina respectivamente.

El problema del control de las garrapatas, de las enfermedades que éstas transmiten y el desarrollo de la resistencia a los plaguicidas, está fuertemente asociado con la inocuidad alimentaria y la salud pública. Además que interfiere en la disminución de la fertilidad del suelo, la reducción de la biodiversidad, la contaminación de aguas subterráneas, ríos y lagos, con consecuencias globales negativas sobre la atmósfera y el clima (Dominguez y Cruz, 2014; Carrillo y Blanco, 2009; Ruvalcaba, 2009; Nari, 1995). Sustancias de uso común para el control de ectoparásitos como las cipermetrinas, el clorpirifos y el diazinón presentan altos coeficientes de partición octanol/agua ( $\log K_{ow}$ ), indicativo de un considerable potencial de acumulación en el suelo y en los tejidos de los seres vivos. Al consumir carne y leche, estas sustancias pueden ser biomagnificadas en los seres humanos (Moncada *et al.*, 2015).

El control biológico es una de las grandes alternativas biotecnológicas, no químicas ni transgénicas que puede utilizarse en los planes de la salud animal (García, 2011). Este es definido por la FAO (2011), como el uso de organismos vivos, para suprimir la densidad de población o el impacto de una plaga en un organismo específico. Las interacciones negativas (amensalismo, depredación y parasitismo) entre las poblaciones bacterianas y entre los microorganismos y organismos superiores han sido siempre la base natural del control biológico de plagas y patógenos. La dependencia de plaguicidas químicos se puede reducir, mediante el empleo controlado de microorganismos (plaguicidas microbianos), patógenos a artrópodos plagas (Atlas y Bartha, 2002). La puesta en práctica de microorganismos para el control de insectos plagas, fue tempranamente propuesta por pioneros notables en la patología de invertebrados, como Agostino Bassi, Louis Pasteur y Elie Metchnikoff (Steinhaus, 1956).

Entre los principales microorganismos que actúan como plaguicidas, están los virus, hongos, bacterias, protozoarios y nematodos (Monzón, 2001; Lacey *et al.*, 2001; Hegedus y Khachatourians, 1995). Los hongos son los microorganismos más utilizados y eficaces en la patología de invertebrados, principalmente insectos y ácaros, sus propiedades adhesivas, y su capacidad de digerir la cutícula, los convierte en ingredientes adecuados de bioacaricidas, pero hasta el momento, solo se han utilizado para controlar plagas de cultivos (Lonc *et al.*, 2014; Jiménez, 2009). En este sentido, productores Nicaragüenses de café, repollo, plátano y chile dulce, han logrado reducir el daño causado por las plagas, mediante el uso de hongos entomopatógenos (Monzón, 2001), tienen la ventaja de no generar resistencia y no producir contaminación (Dong *et al.*, 2016) y permiten el control de artrópodos plagas de cultivos y vectores de enfermedades, en humanos y animales de cría, de una manera segura, ecológica y económicamente viable (Rodríguez, 2009; Zimmermann, 2007a; Lacey *et al.*, 2001).

Se han descrito más de 750 especies de hongos entomopatógenos, pero los más utilizados a nivel mundial son *Metarhizium anisopliae* (33.9%), *Cordyceps* = (*Beauveria*) *bassiana*, (33.9%), *Isaria fumosorosea* (antes *Paecilomyces fumosoroseus*) (5.8%) y *B. brongniartii* (4.1%) (Télez *et al.*, 2009). Los hongos que han sido evaluados para el control de garrapatas son; *I. fumosorosea* (Angelo *et al.*, 2012; Gindin *et al.*, 2001), *C. bassiana* (Sônia *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2006) y *M. anisopliae* (Quinelato *et al.*, 2012; Perinotto *et al.*, 2012; Schrank *et al.*, 2010; Lubeck *et al.*, 2008), los cuales han demostrado tener

potencialidad para el control de distintas fases de desarrollo de la garrapata (huevo, larva, ninfa y adulto) tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. A baja temperatura y baja humedad, pueden parasitar la garrapata a través del ano, estas se ven afectadas por micelios fúngicos y por sus toxinas (Samish y Rehacek 1999). El proceso infeccioso de los hongos entomopatógenos en la garrapata inicia con la adherencia del conidio en el cuerpo de ésta, continuando con la formación de un tubo germinativo y formación del apresorio, el cual inicia la fase de penetración, rompe y atraviesa la cutícula, las hifas crecientes alcanzan el hemocele, éstas se diferencian en blastosporas para evadir el sistema inmune de la garrapata y luego regresan a su formación hifal, ocurriendo la colonización de los órganos internos. Las hifas emergen a la superficie del espécimen muerto y se forman conidióforos, en los cuales se efectúa la producción de conidios (Schrank *et al.*, 2010).

El primer reconocimiento taxonómico del hongo *C. bassiana* fue propuesto por Balsamo-Crivelli, quien en honor a Bassi, denominó al hongo *Botrytis bassiana*. El género *Beauveria*, fue descrito formalmente en 1912, este hongo presenta un aspecto algodonoso de coloración blanca que en ocasiones torna a crema (Vuillemin, 1912). Actualmente se describe como *C. bassiana*, Bals & Vuill, esto debido a que desde el año 2001, se ha descubierto y demostrado mediante métodos convencionales y moleculares, que el teleomorfo de *B. bassiana* es *C. bassiana*, pertenece al orden Hypocreales, dentro de la familia Cordycipitaceae (NCBI, 2015; Lee *et al.*, 2010; Sung, 2007; Zimmermann, 2007a; Huang *et al.*, 2002; Zengzhi, *et al.*, 2001).

*M. anisopliae* Metch & Sorokin, Hypocreales-Clavicipitaceae; es un habitante del suelo, distribuido a nivel mundial, desde el ártico hasta el trópico. El primer uso de *M. anisopliae* como un agente microbiano contra los insectos fue en 1879, cuando Elie Metchnikoff lo aisló del escarabajo del trigo, *Anisoplia austriaca* (Herbst), quien recomendó dispersar conidios, colectando cadáveres del escarabajo del trigo, parasitados por el hongo (NCBI, 2015; Zimmermann, 2007b; Lord, 2005). *M. anisopliae* causa disminución en la tasa de oviposición, incrementa el período de incubación y de eclosión, además produce la muerte de larvas y garrapatas adultas con porcentajes de eficiencia de hasta el 100 % (Ojeda *et al.*, 2011).

*I. fumosorosea* (Wize) Brown & Smith, Hypocreales-Cordycipitaceae, lo describió primeramente Wize en 1904, cuando lo aisló de una larva del picudo de la remolacha *Cleonus punctiventris* en Ucrania. Posteriormente basándose en el estudio monográfico del género *Paecilomyces* realizado por Samson (1974), *I. fumosorosea* se incluyó en la sección denominada *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* y desde entonces se le denominó *Paecilomyces fumosoroseus* por muchos años (Zimmermann, 2008). Sin embargo Luangsa *et al.* (2005) analizaron las especies de *Isarioidea*, utilizando el gen b-tubulina y el ADNr ITS. Los análisis de parsimonia máxima mostraron que la sección no forma un grupo taxonómico natural y es polifilética dentro de los Hypocreales. Sin embargo, reconocen y designan el clado *Isaria* por ser monofilético, que incluye *I. farinosa* e *I. fumosorosea* y se acepta su nueva clasificación. Este hongo ha sido aislado de especímenes muertos de garrapatas (Zimmermann, 2008), hasta donde se conoce, únicamente dos estudios se han reportado con este hongo para controlar *R. microplus*.

De las afirmaciones anteriores, se deduce que es importante la elaboración de garrapaticidas naturales y/o biológicos (extractos botánicos, plaguicidas microbianos) e inmunológicos (vacunas), para que formen parte de un Manejo Integrado de Garrapatas (MIG), que

mantengan la población parasitaria por debajo del Umbral Económico (UE) y que la afectación al ambiente y al ser humano sea mínima o nula. El objetivo de este estudio, fue evaluar el potencial de hongos entomopatógenos Hypocreales como agentes de control microbiano de la garrapata *R. microplus*, ya que éstos al ser inocuos no tienen problemas con residuos y la posibilidad de resistencia por parte de los organismos plagas es muy reducida, tomando en cuenta el mecanismo de acción, único de los hongos entomopatógenos, atravesando la cutícula de los artrópodos mediante fuerzas físicas y la acción enzimática (Villegas, 2011; Monzón, 2001). Se cree que los hongos evaluados en este estudio representan una alternativa promisoría en el control microbiano de la garrapata *R. microplus*.

## II. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Evaluar el potencial de hongos entomopatógenos Hypocreales, como agentes de control microbiano de la garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) Canestrini, 1888.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar morfológicamente cepas de los hongos entomopatógenos, *Metarhizium anisopliae* cepa monte rosa, *Cordyceps = (Beauveria) bassiana* cepa 114 e *Isaria fumosorosea* cepa MB-2015.
2. Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de conidios de los hongos entomopatógenos, *M. anisopliae* cepa monte rosa, *C. bassiana* cepa 114 e *I. fumosorosea* cepa MB-2015 en teleoginas de la garrapata *R. microplus*.
3. Determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y el tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* cepa Monte rosa, *C. bassiana* cepa 114 e *I. fumosorosea* cepa MB-2015, para el control microbiano de la garrapata *R. microplus* en laboratorio.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio consistió en la caracterización de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae*, *C. bassiana* e *I. fumosorosea*. Además de su evaluación en el control microbiano de la garrapata *R. microplus* en condiciones de laboratorio.

#### 3.1. Ubicación geográfica del estudio

La investigación se realizó en los meses de Octubre, 2014 a Febrero, 2016 en el Laboratorio de Hongos Entomopatógenos, de la Facultad de Agronomía, en la Universidad Nacional Agraria, ubicada en la Carretera Norte de la Ciudad de Managua, departamento de Managua. Las coordenadas correspondientes son 12°08'52" Latitud Norte y 86° 09'41" longitud Oeste, el laboratorio se encuentra a una altura de 63 msnm.

#### 3.2. Diseño metodológico

Los bioensayos fueron establecidos en un diseño completamente al azar (DCA) con 6 tratamientos y 5 repeticiones. Los tratamientos evaluados consistieron en seis concentraciones de conidios  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  conidios/ml. Cada unidad experimental estaba conformada por diez garrapatas colocadas en platos Petri de 90 mm. El testigo consistió en la aplicación de agua destilada estéril.

#### 3.3. Manejo del bioensayo

##### 3.3.1. Toma de muestras de garrapatas para identificación taxonómica de *R. microplus*

Las garrapatas se obtuvieron según el método descrito por Alvarado y Dixon (2010), éstas deben desprenderse contrario al pelo, de la piel de los animales, mediante movimientos suaves de torsión, para evitar la ruptura del capítulo con las piezas bucales, que son partes vitales para la identificación de las garrapatas. Las garrapatas se tomaron directamente de la piel del bovino con una pinza entomológica, en el tiempo de ordeño, en la finca San Antonio, ubicada en la Comunidad Colonia Rio Rama, Municipio-El Coral Chontales, propiedad del Señor Juan Pablo López Martínez. Las garrapatas colectadas se almacenaron en tubos de ensayo cerrados con tapa de rosca y en su interior contenían alcohol al 70 %.

Las muestras de garrapatas fueron llevadas al Laboratorio de Parasitología Veterinaria, ubicado en la Facultad de Ciencia Animal (FACA) en la Universidad Nacional Agraria (UNA) Sede Central Managua, para su posterior identificación taxonómica. Para la identificación de los especímenes se utilizó la clave pictórica presentada por Benavidez y López (2005), acompañada de la clave dicotómica de la (CFSPH, 2007). Describiendo las placas estigmáticas, las cuales se localizan detrás del cuarto par de patas y presentan una forma redonda u ovalada y el *capitulum* que posee una base hexagonal.

**3.3.2. Obtención de los hongos.** Los hongo utilizados *C. bassiana* cepa 114, *I. fumosorosea* cepa MB-2015 y *M. anisopliae* cepa monte rosa, fueron obtenidos de la colección de hongos

entomopatógenos de la Universidad Nacional Agraria (UNA); las que se encuentran preservadas en sílica gel y en medios de cultivos, en refrigeración a 4 °C.

### **3.3.3. Bioensayo preliminar para determinar efecto de los hongos entomopatógenos sobre *R. microplus***

Este se realizó utilizando la metodología descrita por (Monzón, S. F), en los meses de Noviembre y Diciembre del 2014. A partir de cultivos puros de los hongos *M. anisopliae* cepa monte rosa, *C. bassiana* cepa 114 e *I. fumosorosea*, se prepararon concentraciones de  $1 \times 10^8$  conidios/ml, con una viabilidad del 95%. Las garrapatas fueron sumergidas en la suspensión conidial ( $1 \times 10^8$  conidios/ml) durante 30 segundos. Se utilizaron tres tratamientos con tres repeticiones cada uno y quince garrapatas *R. microplus* (teleoginas) por repetición y un tratamiento testigo con agua destilada estéril con la misma cantidad de repeticiones y el mismo número de unidades experimentales (garrapatas).

Después de inoculadas, se pasaron en papel toalla estéril para quitar el exceso de agua y se colocaron individualmente en cámaras húmedas la cual consistió de placas petri de 90mm de diámetro con papel filtro en el fondo, humedecido con agua destilada estéril (94 % humedad y temperatura 24 °C) revisando las muestras cada 24 horas, para determinar si existía presencia de micosis en el cuerpo de la garrapata.

### **3.3.4. Aislamiento de los hongos entomopatógenos, pase y preservación en cultivo puro**

Las garrapatas muertas que presentaron signos de micosis y/o colonizadas, fueron utilizadas como fuente de inóculo para la obtención de los hongos utilizados en los bioensayos posteriores. El aislamiento se realizó siguiendo la metodología descrita por (Monzón, S.F) por dilución seriada (colonia monospórica). Se prepararon platos Petri de 90mm de diámetro, con medios de cultivo PDA (papa dextrosa agar) por cada medio de cultivo se prepararon 5 platos los cuales fueron inoculados en una Cabina de flujo laminar clase II. Los medios inoculados se mantuvieron a temperatura de 24°C a 25°C, 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, estos se reaislaron hasta obtener un cultivo puro. A partir del tercer día de incubación se hicieron observaciones, color de la colonia al iniciar y finalizar el crecimiento. El control de calidad de los cultivos puros se realizó mediante la limpieza del cultivo, eliminando las colonias del contaminante y realizando una nueva siembra hasta obtener un cultivo puro, descartando los platos contaminados por otros microorganismos.

### **3.3.5. Reproducción del inóculo**

El hongo fue sembrado en platos Petri conteniendo el medio nutritivo PDA (papa dextrosa agar), luego de ser inoculados se dejaron a una temperatura de 24°C a 28°C por 7 días. Una vez obtenido el cultivo puro se procedió a preparar una matriz líquida del hongo en un medio nutritivo a base de leche de soya en polvo, sacarosa y una fuente nutritiva a base de Nitrógeno. Estos se dejaron en agitación constante a 130 revoluciones por minuto (rpm) durante 90 horas para la obtención de blastosporas, las que fueron utilizadas para la inoculación de las bolsas. La reproducción del hongo empleado para preparar la fuente de inóculo, se hizo mediante el método de producción semi-industrial, utilizando arroz entero como sustrato (Monzón, 2001).

A partir del cultivo líquido (matriz) se preparó una suspensión para inocular el sustrato sólido (arroz) contenido en bolsas de polipropileno de 8 por 12 pulgadas. En cada bolsa se depositaron 200 gramos de arroz y 100 ml de agua, se sometieron a esterilización (Autoclave 120 oC, 1.2 bar).

Las bolsas se dejaron enfriar y se inocularon con 20 ml de la suspensión, y se pusieron en incubación por un periodo de 8 días. Luego el arroz colonizado por el hongo fue depositado en bandejas, para la etapa final de incubación y secado por un período de 15 días, posteriormente se procedió a la cosecha del hongo por el método de tamizado manual y luego el producto cosechado fue utilizado para la realización de los bioensayos. El control de calidad se llevó a cabo en todo el proceso de producción mediante la observación de aspectos como crecimiento y coloración propios del hongo. Se descartó las bolsas que presentaron contaminantes y cuyo crecimiento no fue uniforme.

### 3.4. Establecimiento de bioensayos

Se realizaron tres bioensayos, con cada una de las especies de hongos entomopatógenos evaluadas, utilizando la misma metodología en cada uno de ellos. Los hongos evaluados fueron *M. anisopliae* cepa Monte Rosa, *C. bassiana* cepa 114 e *I. fumosorosea* cepa MB-2015. Los bioensayos fueron establecidos en un diseño completamente al azar (DCA) con 6 tratamientos y 5 repeticiones. Los tratamientos evaluados consistieron en seis concentraciones de conidios  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  conidios por ml (cuadro 1). Cada unidad experimental estaba conformada por diez garrapatas colocadas en platos Petri de 90 mm. El testigo consistió en la aplicación de agua destilada estéril.

Los ensayos fueron realizados de manera independiente y en diferentes fechas, en los meses de junio, julio, agosto, septiembre, octubre, noviembre, diciembre del 2015 y enero y febrero del 2016. Siguiendo la metodología descrita por (Monzón, 2001).

**Cuadro 1.** Tratamientos evaluados en los bioensayos

Tratamiento	Concentración (conidios/ml)
1	$1 \times 10^3$
2	$1 \times 10^4$
3	$1 \times 10^5$
4	$1 \times 10^6$
5	$1 \times 10^7$
6	$1 \times 10^8$
7	Testigo $1 \times 10^0$

#### 3.4.1. Colecta de garrapatas *Rhipicephalus microplus* para bioensayos

Las garrapatas adultas (teleoginas), se obtuvieron de ganado bovino infestado naturalmente con garrapatas y criado extensivamente en pasturas naturales y sin aplicación de baños ni

medicamentos parenterales garrapaticidas previo de 60 días, en la finca san Antonio propiedad del Sr. Juan López Martínez. Estas se desprendieron siguiendo el método descrito por Alvarado y Dixon (2010).

### 3.4.2. Preparación de las muestras de garrapatas para posterior inoculación

Las garrapatas fueron transportadas y llevadas al laboratorio de hongos entomopatógenos, de la Universidad Nacional Agraria UNA; estas se seleccionaron de acuerdo a la especie y estado de desarrollo, descartándose todas las que presentaran daños mecánicos, alteraciones en su cuerpo y pertenecientes a otras especies. Las teleoginas se colocaron en un recipiente y se les practicó un lavado con agua destilada estéril, luego se colocaron en papel toalla para quitar el exceso de agua.

### 3.4.3. Preparación del hongo para la inoculación

Se preparó una dilución seriada con las suspensiones de los hongos en concentraciones de:  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  conidios/ml. El conteo se realizó utilizando la metodología sugerida por Monzón (2001). La primera dilución se obtuvo colocando 1 gr de conidios (pesado previamente en una balanza semianalítica) en un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril, la siguiente dilución se obtuvo transfiriendo con una micropipeta estéril 1 ml de la primera dilución a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril, este se agitó con un vortex durante 3 minutos, hasta que se obtuvo una tercera suspensión de  $10^{-3}$ . Este procedimiento fue continuo hasta que se obtuvo la dilución  $10^{-5}$  con la cual se procedió a realizar el conteo.

Usando una micro pipeta se tomó una alícuota de la suspensión de conidios y se depositó en la cámara de conteo (Neubauer) y luego a través de un microscopio de luz (objetivo de 40X) se realizó el conteo de conidios, dos lecturas por repetición de cada tratamiento. La cámara de conteo es una lámina de vidrio que presenta una ranura en forma de H y contiene dos cámaras entre éstas. Para facilitar el conteo, el fondo de la cámara tiene un rayado “Neubauer”, que consiste de 9 cuadros principales (C.P) de 1 mm por lado. El CP central está dividido en 25 cuadrados secundarios (CS) para propágulos pequeños.

Para calcular la concentración de conidios/ml se sumó la cantidad contenida en los 5 cuadros y se dividió entre 5, que equivale al número de la muestra, este resultado se multiplicó por el factor de cámara y este por el factor de dilución, el factor de cámara para cuadros secundarios es 250,000. El factor de dilución de  $10^{-5}$  es 100 000 (Monzón, 2001).

$$\text{No. de conidios/ml} = \text{No de conidios en el cuadro} * \text{factor de camara} * \text{factor de dilucion}$$

Para ajustar la solución a la concentración deseada se hizo uso de la fórmula presentada por (Lecuona, 1996).

$$\frac{C_f \times V_f}{C_i} = V_i$$

Donde:

$C_i$  = concentración inicial

$V_i$  = volumen inicial

$C_f$  = concentración final

$V_f$  = volumen final

#### **3.4.4. Inoculación de garrapatas**

La inoculación se realizó mediante el método de inmersión, siguiendo la metodología descrita por (Monzón, S. F). Para establecer cada bioensayo se utilizaron placas petri de cristal de 90 mm de diámetro, un total de 35. Se prepararon las suspensiones con cada concentración correspondiente y se sumergieron las garrapatas durante 30 segundos, luego se colocaron 10 garrapatas en cada cámara húmeda al 94 % humedad y temperatura 24 °C (platos Petri esterilizados, con papel filtro estéril en el fondo, humedecido con agua destilada estéril).

Después de realizada la inoculación, se realizó muestreo cada 24 horas. En cada muestreo se registró a las teleoginas vivas, muertas, ovipositando y las que presentaron signos de micosis. Se registró cualquier otro evento asociado al efecto de los hongos sobre las teleoginas y los huevos.

Cada teleogina muerta fue desinfectada superficialmente con hipoclorito de sodio al 2 % y transferida individualmente junto a su postura (masa de huevos) a una cámara húmeda, la que estaba formada por platos Petri conteniendo papel filtro en el fondo, el que era humedecido con agua destilada estéril; los platos Petri con el papel filtro fueron previamente esterilizados (5 minutos a 120°C y 1.2 bares de presión). Las muestras colocadas en cámara húmeda fueron observadas cada 24 horas en el estereomicroscopio, para registrar el crecimiento del hongo sobre la teleogina, signos de micosis y colonización en las masas de huevos y la eclosión de los mismos.

#### **3.5. Variables evaluadas**

- Porcentaje de viabilidad de los conidios.
- Dimensiones de conidios
- Porcentaje de mortalidad de teleoginas de *R. microplus*.
- Porcentaje de parasitismo producido por los hongos entomopatógenos a las teleoginas de *R. microplus*.

##### **3.5.1. Viabilidad de los conidios de los hongos entomopatógenos en medio agar-agua 2%**

Para conocer la viabilidad de los conidios del hongo se utilizó el método descrito por (Monzón, 2001). De acuerdo a este método se preparó un medio agar-agua al 2% y diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  de los hongos en estudio, posteriormente con una micropipeta se depositó una alícuota de agar-agua en un porta objeto cavado, seguidamente se depositó sobre cada alícuota del medio, una alícuota de la dilución  $10^{-4}$  de la suspensión de conidios; finalmente

este montaje se colocó en una cámara húmeda, la cual consistió en un plato petri con papel filtro humedecido con agua destilada estéril, la que fue colocada en un cuarto de crecimiento a temperatura 24 - 26 °C.

Las muestras fueron revisadas a las 18, 20 y 22 horas después de realizado el montaje, registrando el número de conidios germinados y no germinados, considerando germinados aquellas conidios cuyo tubo germinativo fuese al menos la mitad del diámetro del conidio. El conteo de viabilidad se realizó utilizando un microscopio luz 40X y se observaron al menos 200 conidios en cinco repeticiones de la fuente de inóculo a utilizar en el bioensayo. A partir de los datos obtenidos se calculó el porcentaje de conidios germinados utilizando la fórmula propuesta por Monzón (2001).

$$\text{Viabilidad de conidios (\%)} = \frac{\text{número de conidios germinados}}{\text{número total de conidios evaluados}} * 100$$

### **3.5.2. Caracterización macroscópica y microscópica de las colonias y conidios de los hongos entomopatógenos, en medio sólido PDA**

La caracterización microscópica de los hongos, se hizo mediante la metodología descrita por French y Hebert (1982). Las estructuras que fueron caracterizadas se tomaron de los aislamientos obtenidos en el bioensayo preliminar. Las características evaluadas fueron: tamaño, forma y color de las estructuras reproductivas (conidios) y el color de las colonias crecidas y desarrolladas en medio PDA (caracterización macroscópica). Para las mediciones se utilizó un ocular micrométrico, el que fue previamente calibrado utilizando un micrómetro objetivo. Para determinar el tamaño de las estructuras de los conidios se utilizó la fórmula presentada por French y Hebert (1982).

$$\text{Valor Micrométrico} = \frac{\text{Medida micrómetro de platina en micras}}{\text{unidades micrómetro ocular}}$$

### **3.5.3. Mortalidad de teleoginas de *R. microplus***

La mortalidad se registró a partir de los 1 días, durante 30 días. A partir de la mortalidad observada, se realizó la corrección de mortalidad mediante la fórmula propuesta por Abbott (1925).

$$x - \frac{y}{x} * 100 = \text{porcentaje de control}$$

Dónde:

X= % sin respuesta en el testigo

Y= % sin respuesta en el tratamiento

### **3.5.4. Porcentaje de parasitismo producido por los hongos entomopatógenos a las teleoginas de *R. microplus*.**

Se determinó contando el número de garrapatas muertas con signos de micosis en el cuerpo, así mismo las que no presentaron parasitismo, hasta el día 30 después del tratamiento.

### **3.5.5. Recolección de datos**

La recolección de datos de mortalidad, parasitismo y oviposición, se realizó a las 24 horas después de la inoculación, posteriormente se efectuaron muestreos cada 24 horas, se revisó cada unidad experimental (10 garrapata) con el fin de verificar la muerte y algún síntoma y/o signo ocasionado por el hongo. La toma de datos se realizó hasta 21 días después de efectuado el primer muestreo, en el caso de las posturas el muestreo se realizó hasta el día 30.

### **3.5.6. Análisis de datos**

Los datos de morfometría de conidios fueron analizados de forma descriptiva. Los datos de porcentaje de parasitismo por concentración, porcentaje de mortalidad por concentración y porcentaje de viabilidad fueron analizados mediante Análisis de Varianza (ANDEVA) de acuerdo al diseño utilizado (DCA). Antes del análisis los datos de mortalidad fueron transformados mediante corrección de Abbott. Además se realizó separación de medias por Tukey ( $\alpha= 0.05$ ) estos datos se analizaron en el programa INFOSTAT versión 2016I. Los datos para determinar la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) fueron analizados utilizando metodología probit recomendado por Bliss (1934) analizando los datos en el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.1. El tiempo letal medio se obtuvo mediante análisis probit utilizando las  $CL_{50}$  encontradas en el programa SAS.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

En total se evaluaron tres especies de hongos con seis concentraciones de conidios cada uno. Todos los tratamientos fúngicos tuvieron efecto patogénico sobre *R. microplus*. Se observó un mayor efecto de mortalidad y parasitismo en el tratamiento *M. anisopliae* y un menor efecto de mortalidad en el tratamiento *I. fumosorosea*, sin embargo éste tratamiento posee la característica de parasitar las posturas de *R. microplus*. En cuanto a la concentración de conidios, se observó de forma general que las concentraciones altas fueron las que presentaron los más altos niveles de mortalidad y parasitismo en *R. microplus*.

### 4.1. Caracterización de cepas de, *M. anisopliae*, *C. bassiana* e *I. fumosorosea*

Los resultados de la caracterización se muestran en el cuadro 2, se aprecian los diferentes colores de las colonias que diferencia a cada especie, así como la forma y el color de los conidios, uno de las características de las cepas es su capacidad de mantener sus características en diferentes sustratos. En este estudio se observó que las características presentadas en medio PDA (papa dextrosa agar), son similares a las características del cuerpo fructífero encontrado en los especímenes muertos de teleoginas de *R. microplus*.

**4.1.1. *M. anisopliae* cepa monte rosa:** las características encontradas en este hongo son: el color de las colonias, al inicio presentaron un color blanco pero a medida que produjo conidios se tornó verde olivo, los conidios presentaron coloración verde olivo, forma cilíndrica, no septados y midieron 5.3 um de largo x 2.7 um de ancho Zimmermann (2007b), este mismo resultado fue encontrado por Estrada y Pavón (2012), al realizar caracterización morfológica, en esta misma cepa, la cual fue evaluada en un bioensayo para el control de la mosca blanca, *Bemisia tabaci*.

**4.1.2. *C. bassiana* cepa 114:** las colonias de *C. bassiana* presentaron coloración blanca y apariencia algodonosa, esto debido a la abundancia de conidios, luego las colonias se tornaron ligeramente polvorientas y de color amarillo pálido al reverso del plato, al respecto Espinoza y Vallejos (2016), realizaron caracterización macroscópica con la misma cepa utilizada en este estudio, reportaron el crecimiento vertical, coloración blanca y la apariencia de las colonias algodonosas que luego se tornan ligeramente polvorientas. Por otra parte Vuillemin (1912) en su descripción del género *Beauveria*, describe que este hongo presenta un aspecto algodonoso de coloración blanca que en ocasiones torna a crema.

Con respecto a la forma, tamaño y color de los conidios, fue globosa, no septados y midieron 2.5 x 2.5 um, coloración blanco aperlado. Este resultado está dentro del rango según la clave de identificación de Zimmermann (2007a), quien menciona que los conidios miden de 2-3 x 2-2.5 um

**4.1.3. *I. fumosorosea* MB-2015:** presentó una coloración blanca al inicio del crecimiento, en el centro de la colonia inicia una coloración rosada, la cual se va generalizando a medida que va produciendo conidios y transcurriendo el tiempo, los conidios presentaron un color rosado pálido, la forma de los conidios fue ovalada, no septados y midieron 5.1 um de largo x 2.8 um de ancho. Estos resultados son similares a los encontrados por Estrada y Pavón (2012) y a lo reportado por Zimmermann (2008) en su descripción de *I. fumosorosea*.

**Cuadro 2.** Caracterización de cepas de, *M. anisopliae*, *C. bassiana* e *I. fumosorosea* re-aislados de especímenes muertos de *R. microplus*, inoculadas por inmersión.

Hongo	Cepa	Color de las colonias	Conidios				
			Color	Forma	Tamaño (um)		Germinación (%)
					Largo	Ancho	
<i>M. anisopliae</i>	Monte rosa	Verde olivo	Verde olivo	Cilíndrico, no septado	5.3	2.7	95.6
<i>C. bassiana</i>	114	Blanco	Blanco aperlados	Globosa, no septado	2.5	2.5	95.7
<i>I. fumosorosea</i>	MB-2015	Rosado	Rosado pálido	Ovalado, no septado	5.1	2.8	98.1

#### 4.2. Viabilidad de los conidios

La prueba de germinación de conidios indica que el porcentaje de viabilidad resultante es mayor al 95 %. La viabilidad de conidios a las 22 horas fue alta; *M. anisopliae* presentó un porcentaje de germinación 95.6%, *C. bassiana* 95.7 % e *I. fumosorosea* 98.1% (cuadro 2.). Esta característica es deseable en organismos que se utilizan como agentes de biocontrol. Los conidios presentaron crecimiento regular del tubo germinal, para luego diferenciarse en hifas (figura 1).

El ANDEVA realizado indica que existen diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ), en los tres tiempos de muestreos, en la germinación de *M. anisopliae*, el tiempo 22 horas fue el que obtuvo el mayor porcentaje de germinación 95.6% (cuadro 3). Estos resultados son similares a los obtenidos por Estrada y Pavón (2012) que obtuvieron una viabilidad del 95%.

**Cuadro 3.** Germinación de *M. anisopliae* en diferentes tiempos, medio agar-agua 2%

Horas	Porcentaje de germinación	Categoría Tukey (0.05)
18	81.5	A
20	90.2	B
22	95.6	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p: 0.05$ )

El ANDEVA realizado indica que existen diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ), con respecto a los tres tiempos de muestreo de germinación de conidios en *C. bassiana*. El porcentaje de viabilidad de los conidios de *C. bassiana* a las 22 horas fue del 95.7, siendo el valor más alto, en comparación con los tiempos (cuadro 4).

**Cuadro 4.** Germinación de *C. bassiana* en diferentes tiempos, medio agar-agua 2%

Horas	Porcentaje de germinación	Categoría Tukey (0.05)
18	83.2	A
20	89.7	B
22	95.7	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p: 0.05)

En cuanto a *I. fumosorosea*, los tiempos 18 y 20 no son diferentes estadísticamente entre sí, pero si son diferentes para el tiempo 22 horas ( $P < 0.0003$ ), siendo este el que presentó el mayor porcentaje de germinación 98.1% (cuadro 5).

**Cuadro 5.** Germinación de *I. fumosorosea* en diferentes tiempos, medio agar-agua 2%

Horas	Porcentaje de germinación	Categoría Tukey (0.05)
18	93.6	A
20	94.1	A
22	98.1	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p: 0.05)

En otro estudio con el hongo *I. fumosorosea* en el control de *R. microplus* Angelo *et al.* (2012), obtuvieron un porcentaje de germinación superior al 98%, este resultado es idéntico al obtenido en este estudio, la rapidez con la que germina así como el alto porcentaje de germinación de conidios, es una característica fisiológica, que a la vez resulta ventajoso, al utilizar este hongo como agente de control microbiano, ya que esta cualidad está altamente relacionada con la capacidad de parasitar artrópodos hospederos.



**Figura 1.** Germinación de conidios 40x. A: germinación de un conidio de *C. bassiana*, 18 horas después del tratamiento (ddt). B: Conidio de *M. anisopliae* germinado, que presenta crecimiento hifal 20 horas ddt. C: Conidios germinados de *I. fumosorosea* con sus hifas entrelazadas, 18 horas ddt. D: Conidio germinado de *C. bassiana* con hifa bien desarrollada, 22 horas ddt.

### 4.3. Mortalidad de *R. microplus* con diferentes concentraciones de conidios de hongos entomopatógenos

#### 4.3.1. Mortalidad de *R. microplus* causada por *M. anisopliae*

Todas las concentraciones de *M. anisopliae* causaron mortalidad de garrapatas. El porcentaje de mortalidad causado por este hongo en teleoginas de *R. microplus* osciló entre 14 y 92% a los 9 días después de la inoculación. El análisis de varianza indica que existen diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ), en el grado de mortalidad, entre las diferentes concentraciones de *M. anisopliae* aplicadas, mediante el método de inmersión en teleoginas de *R. microplus*. El mayor grado de mortalidad se presentó en la concentración  $1 \times 10^8$  conidios/ml, en la cual la mortalidad fue 92%; sin embargo, el nivel de mortalidad causado por esta concentración no fue estadísticamente diferente al causado por las concentraciones  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^4$ . El menor porcentaje de mortalidad fue ocasionado por la concentración  $1 \times 10^3$  que resultó ser diferente estadísticamente a todas las concentraciones (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Mortalidad de *R. microplus* en diferentes concentraciones de *M. anisopliae* 9 días después de la inoculación

Concentraciones (Conidios/ml)	Porcentaje de mortalidad (Abbott)	Categoría Tukey (0.05)
$1 \times 10^3$	14.00	A
$1 \times 10^4$	58.00	B
$1 \times 10^5$	78.00	BC
$1 \times 10^6$	84.00	BC
$1 \times 10^7$	90.00	BC
$1 \times 10^8$	92.00	BC

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p: 0.05$ )

El porcentaje de mortalidad es alto, principalmente en las cuatro concentraciones más altas de *M. anisopliae*. Este resultado es de mucha importancia, ya que confirma que se puede lograr altas mortalidades de garrapatas en concentraciones altas. Los resultados de este estudio son similares a los obtenidos por Ren *et al* (2012), estos investigadores reportaron que el aislado M.aAT04 del hongo *M. anisopliae* causó más del 90% de mortalidad en la concentración de  $10^7$  conidios/ml, en condiciones de laboratorio.

Lubeck *et al.* (2008), encontraron que cuatro (de 19) aislados de *M. anisopliae* (E6, CARO14, CG47 y CG97) fueron muy virulentos a teleoginas de la garrapata *R. microplus*, y causaron entre 90 y 100% de mortalidad, a la concentración  $1 \times 10^8$ , 4 días después de la inoculación. Según Ojeda *et al.* (2011) el hongo entomopatógeno *M. anisopliae* produce la muerte de larvas y garrapatas adultas con porcentajes de eficiencia de hasta el 100 %.

Quinelato *et al.* (2012), que evaluaron la virulencia de treinta aislados de *M. anisopliae* s.l de diferentes regiones geográficas de Brasil, en larvas de la garrapata *R. microplus*, bajo condiciones de laboratorio, reportan que los niveles de mortalidad encontrados en larvas de *R.*

*microplus* son directamente proporcionales a la concentración de conidios de los aislados de *M. anisopliae*.

Arguedas *et al.* (2008) reportaron que el efecto letal sobre las teleoginas con la concentración de  $10^9$  fue a partir del día 5, aunque la concentración  $10^{10}$  presentó una mortalidad >7% desde el día 3. La mortalidad fue proporcionalmente a la concentración. Se confirma la hipótesis planteada de que *M. anisopliae* representa una alternativa promisoriosa en el control microbiano de la garrapata *R. microplus*.

#### 4.3.2. Mortalidad de *R. microplus* causada por *C. bassiana*

El porcentaje de mortalidad causado por *C. bassiana* en teleoginas de *R. microplus* osciló entre 14 y 84% a los 20 días después de la inoculación. En este mismo período de tiempo se cuantificó la mortalidad en el tratamiento testigo. El análisis de varianza indica que existen diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ), en el porcentaje de mortalidad, entre las diferentes concentraciones de *C. bassiana* aplicadas sobre teleoginas de *R. microplus*.

El mayor grado de mortalidad se presentó en la concentración  $1 \times 10^7$  conidios/ml, en la cual la mortalidad fue 84%; sin embargo, el nivel de mortalidad causado por esta concentración no fue estadísticamente diferente al causado por las concentraciones  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^4$ . La menor mortalidad fue ocasionada por la concentración  $1 \times 10^3$  que resultó ser diferente estadísticamente a todas las concentraciones (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Mortalidad de *R. microplus* en diferentes concentraciones de *C. bassiana* 20 días después de la inoculación

Concentraciones (Conidios/ml)	Porcentaje de Mortalidad (Abbott)	Categoría Tukey (0.05)
$1 \times 10^3$	14.00	A
$1 \times 10^4$	56.00	B
$1 \times 10^5$	60.00	B
$1 \times 10^6$	78.00	B
$1 \times 10^7$	84.00	B
$1 \times 10^8$	78.00	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p: 0.05)

El grado de mortalidad es variado de mediano a alto y se observa que la mortalidad asciende a medida que se aumenta la concentración. Resultados similares obtuvo Alonzo *et al.* (2016) al inocular teleoginas de garrapatas *R. microplus* con el hongo *C. bassiana* cepa BbV03 mostró valores de mortalidad de 86.7% a la concentración  $1 \times 10^8$  conidios/ml a los 20 después de la inoculación. Ren *et al.* (2012) al inocular el aislado BbA T04 del hongo *C. bassiana* encontraron una mortalidad mayor a 80 % en las concentraciones  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$ .

García *et al.* (2015) evaluaron la eficacia *in vitro* de *C. bassiana* en el control biológico de la fase adulta de *R. microplus*. Aplicaron la técnica de inmersión de garrapatas adultas en una

solución con la cepa BbF2011 de *C. bassiana* en concentraciones de  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$  conidios/ml, encontraron que las garrapatas tratadas a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml alcanzaron el 100% de mortalidad al día 15 postratamiento (PT), mientras que las concentraciones  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^4$  conidios/ml lo obtuvieron en los días 18 y 21 PT. Asimismo, las garrapatas en la concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml presentaron una menor postura de huevos y porcentaje de eclosión de larvas que los tratamientos con  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^4$  conidios/ml. La mortalidad fue directamente proporcional a la concentración de *C. bassiana*.

Este estudio tiene similitud con lo reportado por Sônia *et al.* (2012) al inocular la cepa de *C. bassiana* Fitossan 1, encontraron que a la concentración  $1 \times 10^9$  ocurría el 100%, a la concentración  $1 \times 10^8$  un 96% y a la  $1 \times 10^7$  un 100 de mortalidad de las teleoginas de *R. microplus* a los 21 días después de la inoculación.

#### 4.3.3. Mortalidad de *R. microplus* causada por *I. fumosorosea*

El grado de mortalidad causado por *I. fumosorosea* en teleoginas de *R. microplus* osciló entre 2 y 64% a los 15 días después de la inoculación. El análisis de varianza indica que existen diferencias significativas ( $P < 0.0023$ ), en el grado de mortalidad de teleoginas de *R. microplus*, entre las diferentes concentraciones de *I. fumosorosea*. El mayor grado de mortalidad se presentó en la concentración  $1 \times 10^8$  conidios/ml, cuya mortalidad fue 64%; sin embargo, el nivel de mortalidad causado por esta concentración no fue estadísticamente diferente al causado por las concentraciones  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^4$ . La menor mortalidad fue ocasionada por la concentración  $1 \times 10^3$  que resulto ser diferente estadísticamente a todas las concentraciones (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Mortalidad de *R. microplus* en diferentes concentraciones de *I. fumosorosea* 15 días después de la inoculación.

Concentraciones (Conidios/ml)	Porcentaje de Mortalidad (Abbott)	Categoría Tukey (0.05)
$1 \times 10^3$	2.00	A
$1 \times 10^4$	32.00	A B
$1 \times 10^5$	34.00	A B
$1 \times 10^6$	42.00	A B
$1 \times 10^7$	52.00	B
$1 \times 10^8$	64.00	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p: 0.05)

El grado de mortalidad de *R. microplus* por *I. fumosorosea* fue variado, observando un ascenso en la mortalidad, en la medida que se aumenta la concentración. Este resultado difiere en poco a lo reportado por Angelo *et al.* (2012), que obtuvieron una mortalidad de 33.05% a la concentración  $1 \times 10^5$ , 59.19 % en la concentración  $1 \times 10^6$ , 46.16 a la concentración  $1 \times 10^7$  y 28.57 % a la concentración  $1 \times 10^8$ . Esto posiblemente se deba a que existe variación en aislados de la misma especie tal y como lo reportaron Fernandes *et al.* (2006) que estudiaron la variabilidad genética de 50 aislamientos de *C. bassiana* de diferentes regiones geográficas y

observaron una variación de 3 a 100% en cuanto a mortalidad de larvas de *R. microplus* infectadas artificialmente.

En las observaciones realizadas en el transcurso del experimento se pudo determinar, que las hembras tratadas con el hongo no pudieron realizar la conversión apropiada de nutrientes a huevos, ya que el número de estos fue bajo en comparación al grupo control, lo que indica que la generación de garrapatas se reducirá potencialmente y se podrá controlar la población a un nivel aceptable. Todas las concentraciones de *I. fumosorosea* fueron capaces de reducir el porcentaje de eclosión significativamente.

Las teleoginas presentaban problemas físicos a la hora de realizar la oviposición algunas morían en el intento y las que lograban realizarla, la masa de huevos quedaba adherido al orificio genital y al aparato bucal (área ventral), seguido de esto la masa de huevo rápidamente era invadida por el hongo, aniquilándola por completo, los huevos presentaban atrofia y cambio de coloración. Este resultado es similar al reportado por Angelo *et al.* (2012) que observaron una reducción de la masa de huevos de teleoginas y que las masas luego de incubarse presentaban crecimiento del hongo.

Gindin *et al.* (2001) informaron que *C. bassiana* e *I. fumosorosea* normalmente no emergen de la cutícula de la garrapata sino a través de las aberturas naturales y que no forman conidios. En el presente estudio, se observó el crecimiento de los hongos *I. fumosorosea* y *C. bassiana* en las aberturas naturales (espiráculos, ano, poro genital y capitulum), pero además se observó que el micelio emergía de la cutícula de las teleoginas y que también se efectuó la formación de conidios. Al respecto Angelo *et al.* (2012), reportaron que el hongo *I. fumosorosea* emergía de la cutícula de la garrapata, indicando que un crecimiento interno en el hemocele ocurre primeramente, antes de que el hongo emerja a la superficie del cuerpo.

#### **4.4. Parasitismo de *M. anisopliae* en teleoginas de *R. microplus***

El porcentaje de parasitismo causado por *M. anisopliae* en teleoginas de *R. microplus* osciló entre 24 y 100% a los 12 días después de la inoculación. En este mismo período de tiempo no se observó parasitismo en el tratamiento testigo.

El análisis de varianza indica que existen diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ), en el porcentaje de parasitismo, entre las diferentes concentraciones de *M. anisopliae* aplicadas en teleoginas de *R. microplus*. El mayor porcentaje de parasitismo se presentó en la concentración  $1 \times 10^7$  conidios/ml, en la cual el 100% de teleoginas fueron parasitadas por el hongo; sin embargo, el nivel de parasitismo causado por esta concentración no fue estadísticamente diferente al causado por las concentraciones  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^4$ . El menor porcentaje de parasitismo fue ocasionado por la concentración  $1 \times 10^3$ , la que fue estadísticamente similar a la concentración 0, pero diferente al parasitismo causado por las demás concentraciones (Cuadro 9).

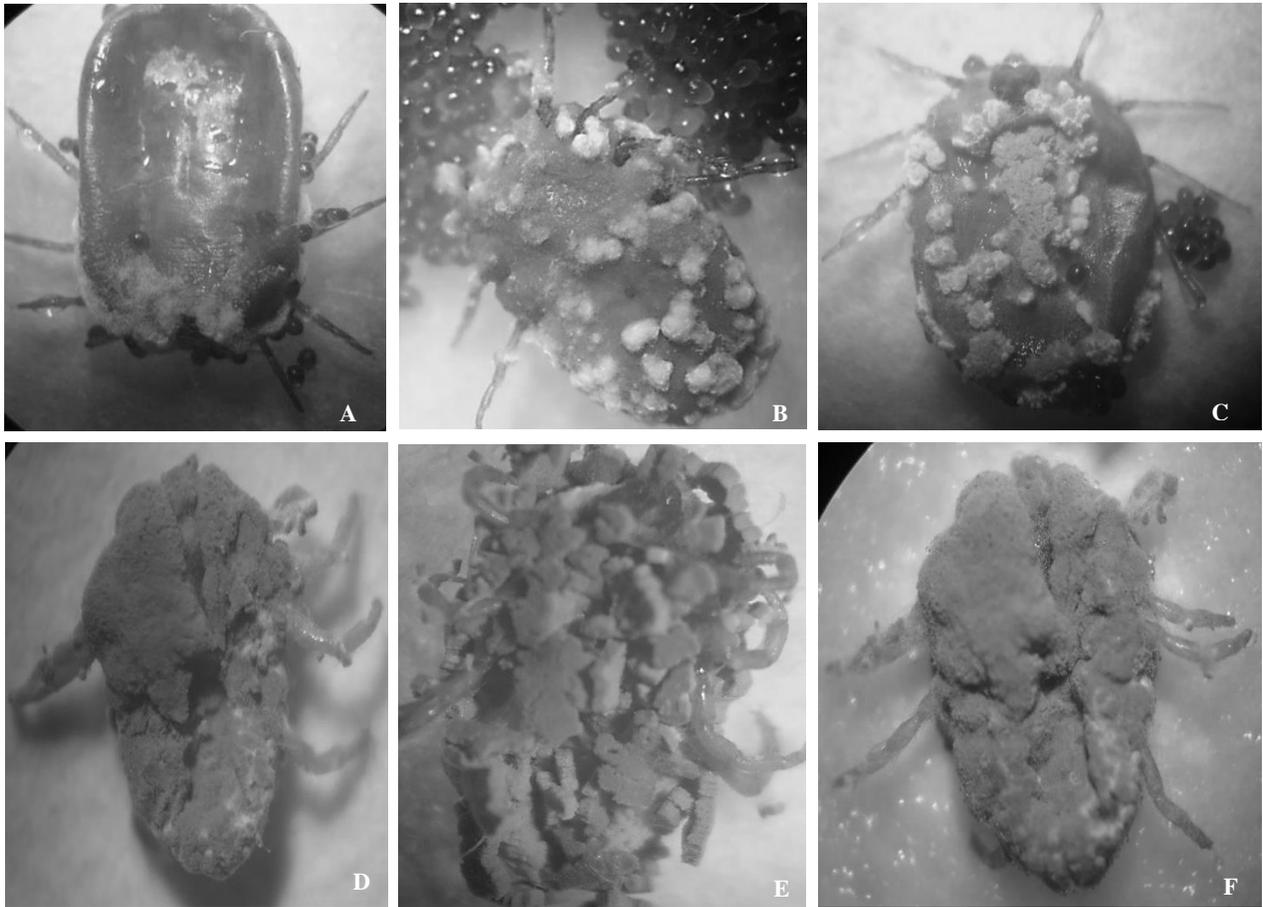
**Cuadro 9.** Comparación de promedios de parasitismo en teleoginas de *R. microplus* ocasionadas por diferentes concentraciones del hongo *M. anisopliae*, mediante prueba de Tukey.

<b>Concentraciones (Conidios/ml)</b>	<b>Parasitismo (%)</b>	<b>Categoría Tukey (0.05)</b>
0	0.00	A
1x10 <sup>3</sup>	24.00	A
1x10 <sup>4</sup>	62.00	B
1x10 <sup>6</sup>	86.00	BC
1x10 <sup>5</sup>	94.00	C
1x10 <sup>8</sup>	94.00	C
1x10 <sup>7</sup>	100.00	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según prueba de Tukey ( $\alpha$ : 0.05)

El parasitismo observado es alto, principalmente en las cuatro concentraciones más altas de *M. anisopliae*. Este resultado es de mucha importancia, ya que por un lado confirma que la muerte es causada por el hongo en estudio, y por otro lado representa un alto potencial de contaminación horizontal, es decir que las teleoginas parasitadas sirvan de inóculo para las no parasitadas.

Este resultado coincide con López *et al.* (2009), quienes evaluaron la capacidad biocontroladora de ocho cepas de *M. anisopliae* sobre la garrapata *R. microplus* en condiciones de laboratorio. En todas las concentraciones utilizadas entre 10<sup>3</sup> y 10<sup>9</sup> conidios/ml observaron esporulación del hongo *M. anisopliae* sobre las garrapatas tratadas, siete días después de la inoculación. Al igual que tiene similitud con lo reportado por Schrank *et al.* (2010) para el tiempo de esporulación del hongo después de la inoculación, que reporta que después de la adhesión del conidio a la cutícula de *R. microplus*, entre 5 y 7 días después ocurre la esporulación en el espécimen muerto.



**Figura 2.** Especímenes muertos de teleoginas de *R. microplus* colonizados por *M. anisopliae*. A. Vista dorsal de una teleogina de *R. microplus* con el micelio de *M. anisopliae* emergiendo del Prosoma. B. Vista ventral de *R. microplus* con signos generalizada de micosis. C. Vista dorsal de *R. microplus*, con signos de micelio y esporulación. D, E y F. Teleoginas de *R. microplus* parasitadas y cubiertas totalmente por el cuerpo de *M. anisopliae*, 12 días después de la inoculación.

Al emerger del espécimen muerto, el micelio de *M. anisopliae*, presentaba una coloración blanca, pero cuando efectuó la producción de conidios se tornó verde. Sobre el asunto Monzón (2001) reportó que los insectos muertos por este hongo, primeramente son cubiertos de micelio de color blanco, pero cuando se da la esporulación este se torna verde.

Luego de haber ocasionado la muerte y colonización de la garrapata, las estructuras de *M. anisopliae* emergieron de la cutícula de la garrapata, posteriormente el hongo efectuó la producción de conidios sobre el cuerpo de la garrapata, coincidiendo con lo reportado por Gindin *et al.* (2001) quienes evaluaron la patogenicidad de *M. anisopliae* en la garrapata *R. (Boophilus) annulatus*, informaron que el hongo emergía directamente de la cutícula de esta garrapata.

Por otra parte Arruda *et al.* (2005), estudiaron con microscopia de luz y de barrido, las alteraciones morfológicas que ocurrían en *M. anisopliae*, durante el proceso de parasitismo en *R. microplus*, encontraron que las hifas emergen de la cutícula de la garrapata, para luego producir conidios.

#### 4.4.1. Parasitismo de *C. bassiana* en teleoginas de *R. microplus*

El porcentaje de parasitismo causado por *C. bassiana* en teleoginas de *R. microplus* osciló entre 32 y 84% a los 23 días después de la inoculación. En este mismo período de tiempo no se observó parasitismo en el tratamiento testigo.

El análisis de varianza indica que existen diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ), en el porcentaje de parasitismo, entre las diferentes concentraciones de *C. bassiana* aplicadas sobre teleoginas de *R. microplus*. El mayor porcentaje de parasitismo se presentó en la concentración  $1 \times 10^8$  conidios/ml, en la cual el 84% de teleoginas fueron parasitadas por el hongo; sin embargo, el nivel de parasitismo causado por esta concentración no fue estadísticamente diferente al causado por la concentración  $1 \times 10^6$ .

El menor porcentaje de parasitismo fue ocasionado por la concentración  $1 \times 10^3$  y fue estadísticamente similar a la concentración  $1 \times 10^4$ , estadísticamente no fueron diferentes de las concentraciones  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^7$ , pero si diferente al parasitismo causado por las demás concentraciones (Cuadro 10).

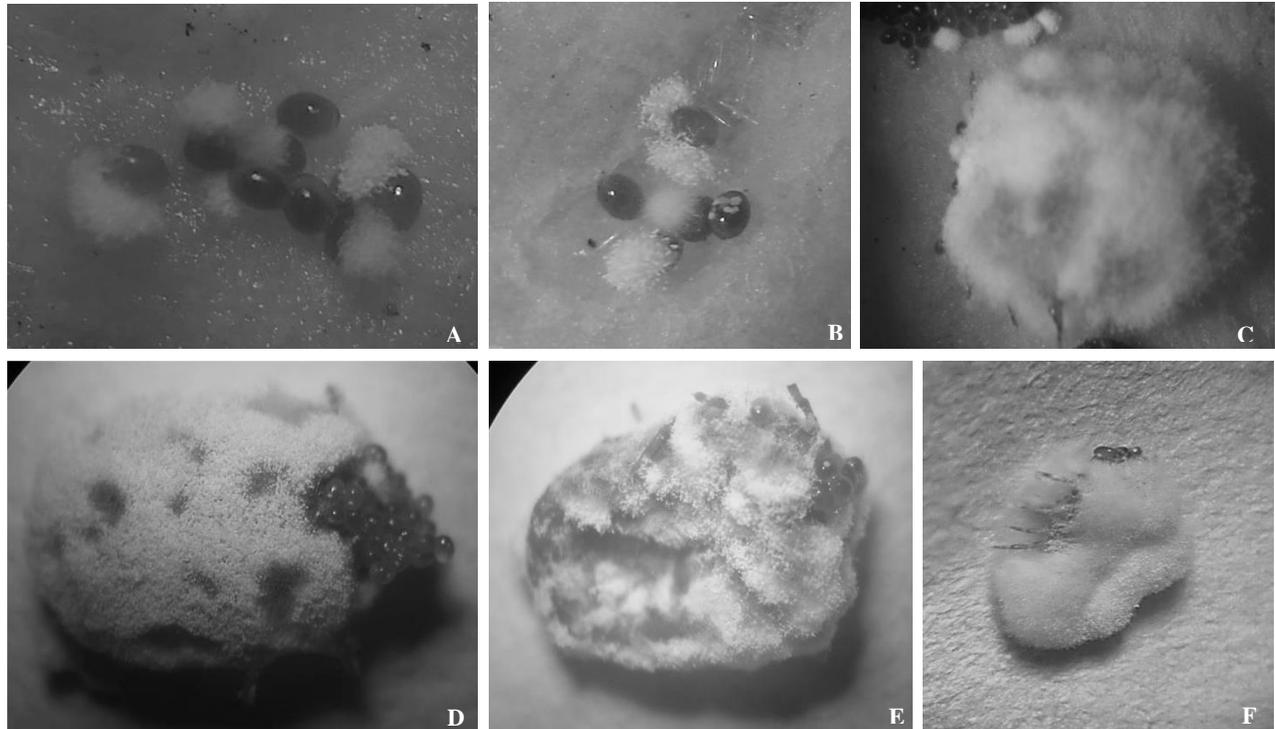
**Cuadro 10.** Comparación de promedios de parasitismo en teleoginas de *R. microplus* ocasionadas por diferentes concentraciones del hongo *C. bassiana*, mediante prueba de Tukey.

Concentraciones (Conidios/ml)	Parasitismo (%)	Categoría Tukey (0.05)
0	0.00	A
$1 \times 10^3$	32.00	B
$1 \times 10^4$	36.00	B
$1 \times 10^7$	46.00	BC
$1 \times 10^5$	48.00	BC
$1 \times 10^6$	64.00	CD
$1 \times 10^8$	84.00	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p: 0.05$ )

El grado de parasitismo observado es variado, el más alto se presentó en la concentración más alta de *C. bassiana*. Este resultado es de mucha importancia, ya que confirma la patogenicidad del hongo en estudio, indicando su valor potencial en el control de garrapatas. El resultado de este experimento es similar al realizado por Fernández (2006), quien encontró valores de parasitismo de un 40 a 50% en condiciones de baja humedad, pero que al aumentar la humedad, la esporulación del hongo en los especímenes muertos de garrapatas aumentó de manera significativa. El porcentaje de humedad está ligado a la emergencia de las hifas a través de la cutícula y la producción de conidios, con la consiguiente presencia externa en el espécimen muerto, del cuerpo fructífero del hongo.

En observaciones realizadas en posturas de *R. microplus*, estas se encontraron parasitadas por *C. bassiana* (figura 3.) determinando un efecto patogénico y ovicida, al impedir la eclosión. Al respecto Posada y Lecuona (2009), al inocular huevos de *R. microplus* con *C. bassiana*, encontraron una disminución en cuanto a la incubación de larvas y eclosión.



**Figura 3.** Posturas y Teleoginas de *R. microplus* colonizadas por *C. bassiana*. A y B. Huevos de *R. microplus* con micelio de *C. bassiana*. C, D, E y F. *R. microplus* con signos externos del cuerpo fructífero de *C. bassiana*, 23 días después de la inoculación.

#### 4.4.2. Parasitismo en teleoginas de *R. microplus* por *I. fumosorosea*

El porcentaje de parasitismo causado por *I. fumosorosea* en teleoginas de *R. microplus* osciló entre el 12 y 94% a los 20 días después de la inoculación. En este mismo período de tiempo no se observó parasitismo en el tratamiento testigo.

El análisis de varianza indica que existen diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ), en el porcentaje de parasitismo, entre las diferentes concentraciones de *I. fumosorosea*. El mayor porcentaje de parasitismo se presentó en la concentración  $1 \times 10^8$  conidios/ml, en la que el 94% de teleoginas fueron parasitadas por el hongo; sin embargo, el nivel de parasitismo causado por esta concentración no fue estadísticamente diferente al causado por la concentración  $1 \times 10^6$ . El menor porcentaje de parasitismo fue ocasionado por la concentración  $1 \times 10^4$ , la que fue estadísticamente similar a la concentración  $1 \times 10^3$ , pero diferente al parasitismo causado por las demás concentraciones (Cuadro 11).

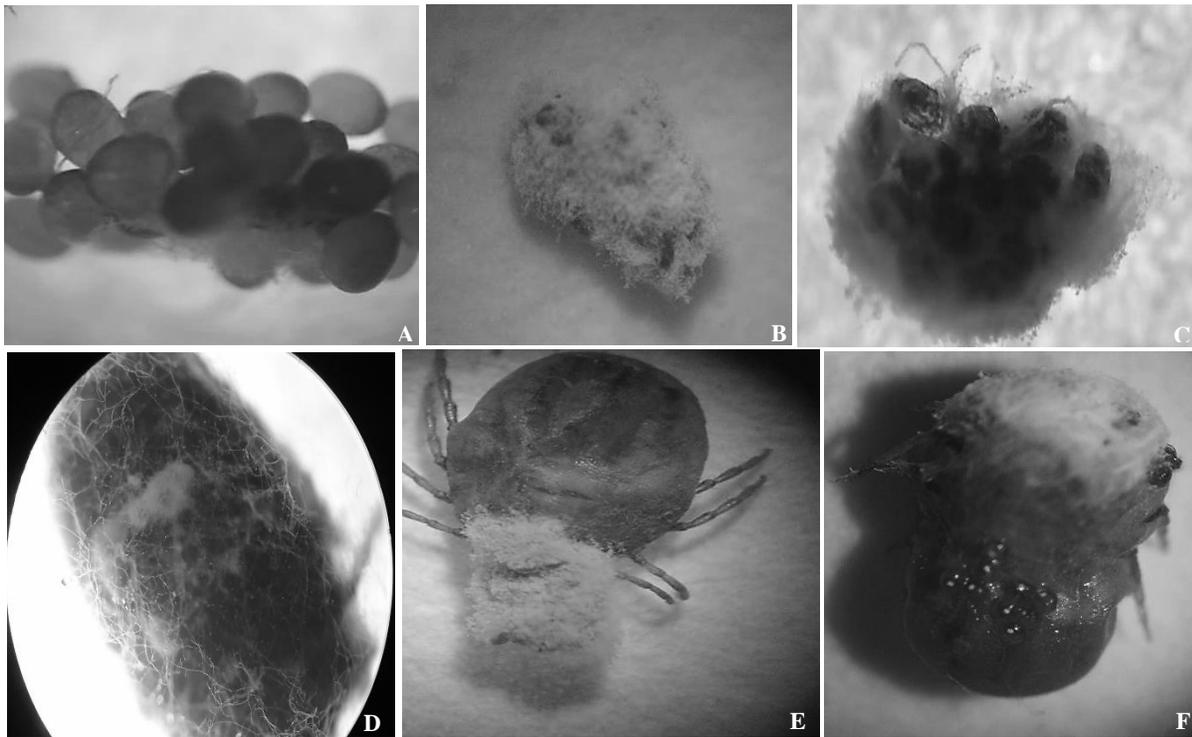
**Cuadro 11.** Comparación de promedios de parasitismo en teleoginas de *R. microplus* ocasionadas por diferentes concentraciones del hongo *I. fumosorosea*, mediante prueba de Tukey.

<b>Concentraciones (Conidios/ml)</b>	<b>Parasitismo (%)</b>	<b>Categoría Tukey (0.05)</b>
0	0.00	A
1x10 <sup>4</sup>	12.00	A
1x10 <sup>3</sup>	20.00	A
1x10 <sup>5</sup>	52.00	B
1x10 <sup>7</sup>	68.00	BC
1x10 <sup>6</sup>	76.00	CD
1x10 <sup>8</sup>	94.00	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p: 0.05)

El grado de parasitismo observado es alto, principalmente en las tres concentraciones más altas. Este resultado es de mucha importancia, ya que por un lado confirma que la muerte es causada por el hongo en estudio, y por otro lado representa un alto potencial de contaminación horizontal. Hasta donde se conoce no existen estudios previos que muestren parasitismo del hongo *I. fumosorosea* en la garrapata *R. microplus*, únicamente se han reportado datos de porcentaje de mortalidad y no datos de porcentaje de parasitismo.

En este estudio se pudo notar una relación entre la teleogina parasitada y su capacidad disminuida para efectuar la oviposición (figura 4), en el momento en que la teleogina inicia la oviposición, el hongo presenta un rápido y notable crecimiento micelial, el cual obstruye el poro genital, evitando que la oviposición se complete, los pocos huevos que salen al exterior, son rápidamente parasitados y no ocurre la formación del embrión. Los huevos parasitados no eclosionan. El proceso de parasitismo en los huevos deberá ser estudiado a mayor profundidad con el objetivo de verificar si el parasitismo del hongo en éstos, ocurre en el interior del cuerpo de la garrapata, o si son infectados al momento de la oviposición.



**Figura 4.** Posturas y Teleoginas de *R. microplus* parasitadas por *I. fumosorosea*. A, B y C. posturas de *R. microplus* parasitadas por *I. fumosorosea*. D, E y F. *R. microplus* parasitadas, obsérvese la obstrucción del área ventral y el poro genital, por el micelio del hongo, evitando la oviposición, 20 días después de la inoculación.

#### 4.5. Concentración letal media (CL<sub>50</sub>)

##### 4.5.1. *M. anisopliae* cepa monte rosa

En el bioensayo de patogenicidad de *M. anisopliae*, en teleoginas de *R. microplus*, se encontró una alta susceptibilidad en todas las concentraciones de conidios aplicadas, la CL<sub>50</sub> encontrada fue  $1.2 \times 10^4$  conidios/ml (cuadro 12). La CL<sub>50</sub> encontrada es baja, indicando un alto grado de patogenicidad.

El alto grado de parasitismo y mortalidad en *R. microplus*, ocasionado por *M. anisopliae*, lo convierte en un microorganismo con un alto potencial, para emplearse en el control biológico de esta plaga del bovino. Al respecto Fernández *et al.* (2010) encontraron valores de CL<sub>50</sub> similares, al evaluar la cepa ECS1 de *M. anisopliae*, en dos cepas de *R. microplus*, una sensible y otra resistente a organofosforados, encontraron una CL<sub>50</sub> de  $1 \times 10^2$  conidios/ml, para la cepa de *R. microplus* resistente a los organofosforados y de  $1 \times 10^3$  conidios/ml para la cepa susceptible.

De igual manera, este resultado es similar a los obtenidos por López *et al.* (2009), quienes evaluaron cepas de *M. anisopliae* en larvas de *R. microplus* y encontraron una alta susceptibilidad de las larvas a todas las cepas de *M. anisopliae* evaluadas, encontrando una CL<sub>50</sub> en un rango entre  $1,57 \times 10^4$  y  $6,33 \times 10^4$  conidios/ml.

La variabilidad genética es una realidad en las especies, esta característica puede explicar los diferentes resultados obtenidos en cuanto a CL<sub>50</sub>, tal y como lo reportaron Fernandes *et al.* (2006), que observaron una variación de 3 a 100% en cuanto a mortalidad de larvas de *R. microplus*, infectadas con 50 aislamientos, de *C. bassiana* de diferentes regiones geográficas. La patogenicidad y virulencia de un entomopatógeno, puede variar considerablemente, en cuanto a patogenicidad, virulencia y rango de hospederos, por tanto cada país debe realizar estudios con cepas nativas, de sus diferentes regiones geográficas.

#### 4.5.2. *C. bassiana* cepa 114

El hongo entomopatógeno *C. bassiana*, resultó ser patogénico a teleoginas de *R. microplus*, presentando una CL<sub>50</sub> de 1.9x10<sup>4</sup> conidios/ml (cuadro 12). Una característica de esta cepa es su capacidad de parasitar a *R. microplus* y provocar una mortalidad de media a alta, con un grado de parasitismo de medio a alto, estas características y su alto porcentaje de germinación, indican que este entomopatógeno posee características importantes, para su utilización como controlador biológico de *R. microplus*. Los resultados en esta investigación son diferentes a los reportados por otros investigadores, Fernandes *et al.* (2005), encontraron una CL<sub>50</sub> de 2.06x10<sup>5</sup> en el aislado Bb32, Bb08 1.11x10<sup>5</sup> y el Bb33 7.89x10<sup>4</sup>. Indicando una variabilidad en la virulencia de cada aislado.

#### 4.5.3. *I. fumosorosea* cepa MB-2015

El resultado para la CL<sub>50</sub> de *I. fumosorosea* en *R. microplus* fue de 5.1x10<sup>6</sup> (cuadro 12), un valor alto en comparación con el resultado obtenido en los demás hongos entomopatógenos, empleados en las pruebas de patogenicidad y virulencia en *R. microplus*. Sin embargo todas las concentraciones tuvieron efecto patogénico en las teleoginas tratadas, un resultado de gran importancia encontrado en este estudio, es la capacidad de este entomopatógeno para parasitar las posturas del ectoparásito, evitando de esta forma la eclosión de los huevos. Si bien es cierto que estos resultados son en condiciones de laboratorio, sin embargo al momento que la teleogina efectúa la oviposición en condiciones naturales, esta busca lugares oscuros y húmedos, los cuales son propicios para que los hongos entomopatógenos puedan realizar su efecto parasítico. La CL<sub>50</sub> encontrada en este estudio difiere de lo reportado por Angelo *et al.* (2012), ellos encontraron una CL<sub>50</sub> de 7.45x10<sup>10</sup> conidios/ml, a los 15 días después del tratamiento.

**Cuadro 12.** CL<sub>50</sub> (conidios/ml) valores obtenidos de teleoginas de *R. microplus* tratados con seis concentraciones de, *M. anisopliae*, *C. bassiana* e *I. fumosorosea*

Hongos	CL <sub>50</sub>	95 % LC	Limites Fiduciales
<i>M. anisopliae</i> Monte rosa	1.2 x10 <sup>4</sup>	4845	28434
<i>C. bassiana</i> 114	1.9 x10 <sup>4</sup>	4068	61263
<i>I. fumosorosea</i> CR	5.1 x10 <sup>6</sup>	1511201	28289215

#### 4.6. Tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>)

La virulencia de las cepas de los hongos entomopatógenos se midió en términos del tiempo requerido para matar al 50% de la población (TL<sub>50</sub>). Este resultado varió con respecto al hongo evaluado. El menor TL<sub>50</sub> (8.62 días) se obtuvo del tratamiento *M. anisopliae* en la concentración 1x10<sup>4</sup> y el mayor TL<sub>50</sub> (18.49 días) fue presentado por *C. bassiana* en la concentración 1x10<sup>4</sup> (cuadro 13).

**4.6.1. *M. anisopliae* cepa monte rosa**, el tiempo letal medio obtenido con *M. anisopliae* fue de 8.6 días, obtenido con la concentración 1x10<sup>4</sup> (cuadro 13), este es el menor TL<sub>50</sub> encontrado en este estudio, la alta virulencia presentada por este hongo, lo convierte en el entomopatógeno más promisorio para el control de garrapatas en estado adulto.

**4.6.2. *C. bassiana* cepa 114**, presentó un TL<sub>50</sub> de 18.5 días a la concentración 1x10<sup>4</sup> (cuadro 13). El TL<sub>50</sub> de *C. bassiana* en *R. microplus* fue el más alto en comparación con los resultados obtenidos con los otros hongos descritos en este estudio. Este resultado indica que a concentraciones bajas de conidios, el entomopatógeno ejerce mediana virulencia en *R. microplus*.

**4.6.3. *I. fumosorosea* cepa MB-2015**, presentó un TL<sub>50</sub> de 16.7 días a la concentración 1x10<sup>7</sup> (cuadro 13), este hongo presente una virulencia media a *R. microplus* y presenta la concentración más alta, para lograr este TL<sub>50</sub>, en comparación con el resultado obtenido de los otros tratamientos realizados en el estudio.

**Cuadro 13.** Tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) de *M. anisopliae*, *C. bassiana* e *I. fumosorosea* en Teleoginas de *R. microplus*

Hongos	TL <sub>50</sub> (días)	Concentración (Conidios/ml)
<i>M. anisopliae</i> Monte rosa	8.60 (8.11-9.41)	1x10 <sup>4</sup>
<i>C. bassiana</i> 11	18.50 (17.95-19.18)	1x10 <sup>4</sup>
<i>I. fumosorosea</i> CR	16.70 (12.65-30.56)	1x10 <sup>7</sup>

## V. CONCLUSIONES

*M. anisopliae*, *C. bassiana* e *I. fumosorosea* tuvieron efecto patogénico sobre teleoginas de *R. microplus*, siendo *M. anisopliae*, quien presentó el mayor porcentaje de mortalidad y parasitismo.

La menor CL<sub>50</sub> encontrada en este estudio fue de  $1.2 \times 10^4$  conidios/ml, correspondiente a, *M. anisopliae*, seguida por *C. bassiana*  $1.9 \times 10^4$  conidios/ml e *I. fumosorosea* con  $5.1 \times 10^6$  conidios/ml

El hongo que alcanzó el 50% de mortalidad en menor tiempo, fue *M. anisopliae*, con un Tiempo Letal Medio de 8.6 días, seguido por *I. fumosorosea* con 16.6 días y *C. bassiana* con 18.5 días.

Además del efecto sobre teleoginas de *R. microplus*, se observó que el hongo *C. bassiana*, afecta su oviposición e incubación.

En general las concentraciones mayores ocasionaron mayor mortalidad de teleoginas de *R. microplus*, sin embargo, en muchos casos estas no fueron estadísticamente diferentes a la mortalidad causada por concentraciones más bajas.

La caracterización permitió la identificación taxonómica de los hongos y se determinó un alto porcentaje de viabilidad de los conidios, siendo mayor en *I. fumosorosea*.

Los resultados de este estudio determinaron que *M. anisopliae* presentó mejores características como agente de control microbiano de teleoginas de *R. microplus*.

De forma general todos los hongos resultaron ser patogénicos y virulentos, a las teleoginas de *R. microplus*, afectando mediante el parasitismo, su supervivencia y oviposición.

## VI. RECOMENDACIONES

Realizar estudios de campo, con las cepas y concentraciones evaluadas en este estudio, aplicando directamente en el bovino y en pasturas.

Evaluar otras cepas de hongos entomopatógenos incluyendo nativas, para el control de *R. microplus* a fin de disponer de diversas cepas de hongos que puedan ser empleadas en programas de control de esta plaga.

Realizar estudios histopatológicos en garrapatas y posturas parasitadas, con la finalidad de contribuir al conocimiento en cuanto al modo de acción y el daño, ocasionado por estos entomopatógenos a *R. microplus*.

## VII. LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18: 265-267.
- Acosta, D.; Gómez, P.; Hernández, V.; Aranda, E. 2007. Métodos de control biológico para *Boophilus microplus* (CAN.). *Investigación Agropecuaria*. 2007. 4:155-166.
- Aiello, S. 2000. El Manual Merck de veterinaria 5ta edición. Whitehouse station, N.J.USA. 2558 p.
- Almada, A. 2015. Parasitosis: pérdidas productivas e impacto económico. Sitio argentino de producción animal. 5 p. disponible en <http://www.produccion-animal.com.ar>.
- Alonso, M.; Alonso, R.; Fernández, A. 2016. Eficacia Garrapaticida de *Beauveria Bassiana* Aislado de Ranchos de Producción Bovina Contra *Rhipicephalus Microplus*. PECU-2. Disponible en <http://www.avc.org.mx>
- Alvarado Artola, RJ.; Dixon Méndez, JB. 2010. Identificación de las principales especies de garrapatas que afectan al ganado bovino en el municipio de Mulukuku, RAAN. Tesis Lic.MV. Universidad Nacional Agraria. Managua, NI. 25 p.
- Angelo, I.; Fernandes, E.; Bahiense, T.; Perinotto, W.; Golo, P.; Moraes, A.; Bittencourt. V. 2012. Virulence of *Isaria* sp. and *Purpureocillium lilacinum* to *Rhipicephalus microplus* tick under laboratory conditions. *Parasitol Res* 111:1473–1480
- Arguedas, M.; Álvarez, V.; Bonilla, R. 2008. Eficacia del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en el control de *Boophilus microplus* (Acari: ixodidae). *Agronomía Costarricense* 32:137-147.
- Arruda, W.; Lubeck, I.; Schrank, A.; Vainstein; M. 2005. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*. 37: 231-244.
- Atlas, R.; Bartha, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Edi. I. Capela. 4ª edición. 2002. Madrid, España. Pearson education, S.A. 677 p.
- Avalos, A.; Vázquez, C.; Gutiérrez, R.; Mendoza, C. 2015. Selection of isolates of entomopathogenic fungus for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: ixodidae). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*.18:175-180 p.
- Balladares, C.A. 1983. Dinámica de la Garrapata en Nicaragua. Ministerio de desarrollo Agropecuario y Reforma Agraria. Dirección General de técnicas Agropecuarias, Managua, Nicaragua. Empresa Nicaragüense de Ediciones Culturales. 119 p.
- Barker, S.; Murrel, A. 2008. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Ticks: Biology disease and control* Eds. A. Bowman y P. Nuttal. Cambridge University Press. 39 p.

- Benavidez, E.; López, G. 2005. Clave pictórica para la identificación de garrapatas en Colombia y Norte de Sudamérica. Corpoica. 16 p. disponible en <http://www.corpoica.org.co/>
- Beeby, J. 2010. Cambio climático y cultive biointensivamente. Ecology Action. California USA. Disponible en <http://www.growbiointensive.org>
- Bliss, C. I. 1934. The method of probits. *Science*. 79. 2037:38-39.
- Botello, AR.; Botello, AL.; Borroto, C.; Suárez, M, Pérez.; Dunia, A.; Rodríguez, Y.; Fajardo, H.; Pérez, K.; González, A.; Rodríguez, A.; Linares, B.; Colicchia, M.; Gómez, I.; Peraza, P.; Gort, A. 2011. Control de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos con el inmunógeno Herber biogar. REDVET. 12: 1-10. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050511/051112.pdf>.
- Burger, T.; Shao, R.; Barker, S. 2014. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 76: 241-253.
- Campos, R.; Boldo, J.; Pimentel, I.; Dalfovo1, V.; Araújo, W.; Azevedo, J.; Vainstein, M.; Barros, N. 2010. Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* sp to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Genetics and Molecular Research*. 9 (3): 1421-1430.
- Carrillo, M.; Blanco, A. 2009. Potencial y algunos mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos para el control de insectos plagas. *Acta universitaria*.19: 40-49
- CFSPH The Center for Food Security & Public Health. 2007. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Garrapata del ganado del sur, garrapata del ganado bovino. Iowa State University. 3 p disponible en <http://www.cfsph.iastate.edu>.
- Díaz, ER. 2012. Mecanismos moleculares y bioquímicos de resistencia a acaricidas en la garrapata común de los bovinos *Rhipicephalus microplus*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*.5:72-81.
- Dominguez, D.; Cruz, R. 2014. Perspectivas de la investigación genómica en el control de la garrapata y las enfermedades que transmite. II Simposio internacional de resistencia a los pesticidas en artrópodos, 2009. Eds. D. Domínguez, R. Cruz, M. Ortiz. Mérida, Yucatán, MX. Universidad Autónoma de Guerrero. 108 p.
- Dominguez, D.; Cruz, R.; Ortiz, M. 2013. El control integral de garrapatas y moscas del ganado y la mitigación de la resistencia a los pesticidas. Memorias III Simposio Internacional de Resistencia a los pesticidas en artrópodos. Eds D. Domínguez, R. Cruz, M. Ortiz Ixtapa, Zihuatanejo, MX. Universidad Autónoma de Guerrero. 107 p
- Domínguez, D.; Cruz, R.; Almazán, C.; Saltijeral, J.; De la Fuente, J. 2010. *Boophilus microplus*: Aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12: 181 - 192

- Dong, T.; Zhang B.; Jiang, Y.; Hu, Q. 2016. Isolation and Classification of Fungal Whitefly Entomopathogens from Soils of Qinghai-Tibet Plateau and Gansu Corridor in China PLOS ONE 11:1-12.
- Elsik, C.; Tellam, R.; Worley, K. 2009. The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution. Science. 324:522-527.
- Espinoza Ruiz, GC.; Vallejos Treminio, FL. 2016. Desarrollo de formulaciones bioplaguicidas a base de *Beauveria bassiana* (Bals & Vuils) con materiales sólidos y líquidos. Tesis Ing. Agrónomo. Universidad Nacional Agraria. Managua, NI. 33p.
- Estrada Ocampo, MM.; Pavón Muñoz, JM. 2012. Uso de hongos entomopatógenos para el control de mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en diferentes especies de plantas hospederas bajo condiciones de invernadero. Trabajo de diploma. Universidad Nacional Agraria. Managua, NI. 31p.
- FAO, 2003. Resistencia a los Antiparasitarios: Estado Actual con Énfasis en América Latina. FAO. Roma, IT. 40 p.
- FAO, 2009. El estado mundial de la agricultura y la alimentación, 2009. El ganado y la salud humana y animal. 22 p disponible en <http://www.fao.org/publications/es/>.
- FAO, 2011. Biotechnologies for Agricultural Development. Roma, IT. 569 p. Disponible en <http://www.fao.org/biotech/>
- FAO. 2010. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura, eds. Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Roma (disponible en <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm>) (traducción de la versión original en inglés, 2007).
- FAO, 2012. Experiencias exitosas de integración asociativa de productores lecheros familiares: tres estudios de casos en Nicaragua, Ecuador y Paraguay. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, División de Producción y Sanidad Animal. 58 p.
- Fernandes, E.; Angelo, I.; Rangel, D.; Bahiense, T.; Moraes, A.; Roberts, D.; Bittencourt, V. 2011. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. Veterinary Parasitology. 182 (2011): 307– 318
- Fernandes, E.; Costa, G.; Moraes, A.; Zahner, V.; Bittencourt, V. 2006. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. Parasitol Res 98:324–332
- Fernández, M.; Zhioua, E.; Garcia, Z. Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Boophilus microplus* sensible y resistente a los organofosforados. Tec Pec Mex. 43:433-440.

- Fernández Tondelli, JA. 2006. Evaluación de la eficiencia del control de garrapatas (*Boophilus microplus*) con tres frecuencias de aplicación de BAZAM® (*Beauveria bassiana*). Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras. 22 p.
- French, E.; Hebert, T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. Ed. M. de la Cruz. Primera edición. San José, CR. 290 p.
- FUNICA. 2012. Estado actual, oportunidades y propuestas de acción del sector agropecuario y forestal de Nicaragua. 1ª ed. Managua, NI. 104 p.
- García, C. 2011. Tecnologías de Control Biológico de Parásitos en Ganadería Ecológica. AE. 3:28-30.
- García, D.; Rodríguez, R.; Pulido, M.; Díaz, A.; Andrade, R. 2016. Evaluación *in vitro* de *Cordyceps bassiana* (Ascomycota: Sordariomycetes) en el Control Biológico de *Rhipicephalus microplus*. Rev Inv Vet Perú. 27(1): 130-136.
- Gindin, G.; Samish, M.; Alekseev, E.; Glazer, I. 2001. The Susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) Ticks to Entomopathogenic Fungi. Biocontrol Science and Technology. 11: 111-118
- Guglielmone, A.; Robbins, R.; Apanaskevich, D.; Petney, T.; Estrada, A.; Horak, I.; Shao, R.; Barker, S. 2010. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. Zootaxa. 28:1-28.
- Hegedus, D.; Khachatourians, G. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. Biotechnology advances. 13: 455-490.
- Huang, B.; Ru li, Ch.; Gang li, Z.; Zhen Fan, M.; Zhi li, Z. 2002. Molecular identification of the teleomorph of *Beauveria bassiana*. 81: 229-236.
- IICA.; MAGFOR.; JICA. 2004. Cadena agroindustrial carne bovina. Análisis estudio de cadena agroproductiva: carne. Managua, NI. 104 p.
- Jiménez, E. 2009. Métodos de control de plagas. Ed. E Jiménez. 1ª ed. Managua NI. UNA. 172 p.
- Lacey, L.; Frutos, R.; Kaya, H.; Vail, P. 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? Biological Control. 21: 230–248
- Leucona, R. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. Técnicas empleadas con hongos entomopatógenos. Ed. Leucona, R. Pra edición. Buenos aires. AR. 338 p.
- Lee, J.; Shrestha, B.; Sung, G.; Han, S.; Mo Sung, J. 2010. Successful Development of *Cordyceps bassiana* Stromata from *Beauveria bassiana*. Mycobiology. 38.1:13-16.

- Lonc, E.; Guz-Regner, K.; Kiewra, D.; Szczepańska, A. 2014. Insight into tick biocontrol with special regard to fungi. *Annals of Parasitology*, 60. 3:169–177p.
- López, E.; López, G.; Orduz, S. 2009. Control de la garrapata *Boophilus microplus* con *Metarhizium anisopliae*, estudios de laboratorio y campo. *Revista Colombiana de Entomología*. 35: 42-46.
- Lord, J. 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology*. 89:19-29.
- Lubeck, I.; Arruda, W.; Souza, B.; Stanisçuaski, F.; Carlini, C.; Schrank, A.; Vainstein, M. 2008. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Ecology I*: 78 -88
- Luangsa, J.; Hywel, N.; Manoch, L.; Samson, R. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycol. Res.* 109. 5: 581-589.
- Manzano, R.; Díaz, V.; Pérez, R. 2012. Garrapatas: Características Anatómicas, Epidemiológicas y Ciclo Vital. Detalles de la Influencia de las Garrapatas Sobre la producción y Sanidad Animal. Sitio argentino de producción animal: 1-8 p.
- Microsoft® Encarta®. 2009. Ganadería. [DVD]. Microsoft Corporation, 2008. Consultado en diciembre 2014.
- Moncada, A.; Argaiz, D.; Chaparro, J.; Angulo, J.; Mahecha, L. 2015. Aproximación al uso de hongos entomopatógenos y vacunas para el control sostenible de garrapatas en sistemas ganaderos: revisión. *AIA*. 19 (3): 55-71.
- Monzón, A. 2001. Producción, Uso y Control de Calidad de Hongos Entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*. 63: 95-103.
- Monzón, A. S. F. Producción y uso de hongos entomopatógenos. Ed. A. Monzón. UNA. NI. 63 p.
- Mora, C. 1998. Revisión sobre la problemática y los últimos avances en el control de la garrapata *Boophilus microplus*. *Encuentro Año XXX*. 46: 40-45.
- Murrel, A.; Barker, S. 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*. 56:169–172.
- Nari, A. 1995. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Veterinary Parasitology*. 57:153-165
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. NCBI Taxonomy browser. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=cordycipitaceae>. Consultada en Enero 2015 de 2015.

- NCBI. National Center for Biotechnology Information. NCBI Taxonomy browser <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=ixodidae>. Consultada en Enero de 2015.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. NCBI Taxonomy browser. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=clavicipitaceae>. Consultada en Enero de 2015.
- Núñez, J.; Muñoz, M.; Moltedo, H. 1982. *Boophilus microplus*. La garrapata común del ganado vacuno. Pra ed. Buenos aires, AR, Editorial Hemisferio Sur S.A. 184 p.
- Ojeda, M.; Rodríguez, R.; Galindo, E.; Lezama, R.; Cruz, C. 2011. Control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) using the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Review. Rev Mex Cienc Pecu. 2: 177-192.
- Pardo, E.; Buitrago, M. 2005. Parasitología veterinaria I. Managua, NI. UNA.124 p.
- Perinotto, W.; Angelo, I.C.; Golo, P.S.; Quinelato, S.; Camargo, M.G.; Sá, F.A.; Bittencourt, V.R. 2011. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. Experimental Parasitology 130 (2012): 257–260.
- Posada, J.; Lecuona, R. 2009. Selection of Native Isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for the Microbial Control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol. 46 (2): 284-291.
- Quiroz, H. 1990. Parasitología. Primera edición, D F, MX, Editorial Limusa, S.A de C.V. 786 p.
- Quinelato, S.; Golo, P.; Perinotto, W.; Sá, F.; Camargo, M.; Angelo, I.; Moraes, A.; Bittencourt, V. 2012. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. Veterinary Parasitology 190 (2012): 556–565.
- Ren, Q.; Liu, Z.; Guan, G.; Sun, M.; Ma, M.; Niu, Q.; Li, Y.; Liu, A.; Liu, J.; Yang, J.; Yin, H.; Luo, J. 2012. Laboratory evaluation of virulence of Chinese *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to engorged female *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. Biological Control 63:98–101.
- Rijo, E. 1997. Control biológico de garrapatas con hongos entomopatógenos. Agricultura orgánica n° 2 y 3:25-26.
- Rodríguez, R.; Rosado, J.; Ojeda, M.; Pérez, L.; Martínez, I.; Bolio, M. 2014. Control Integrado de Garrapatas en la Ganadería Bovina. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios.3: 295-308.
- Rodríguez Gómez, D. 2009. “Caracterización Fisiológica de una Cepa Silvestre de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill y su Mutante Resistente a 2-Desoxiglucosa”. Tesis PhD. En Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.MX 176 p.

- Ruvalcaba, M. 2009. Perspectivas de control biológico parasitario y nuevas alternativas en el sector pecuario. Manejo integrado de *Boophilus microplus*. INIFAP. MX. 41p
- Samish, M.; Rehacek, J. 1999. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annu. Rev. Entomol.* 44:159-182
- Schrank, A.; Vainstein, M.H. 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56:1267–1274.
- Sequeira, M. 2016. Descubre Chontales: un tesoro entre arqueología, carne y leche. Producción cárnica ha mejorado en Nicaragua. *El Nuevo Diario*. Managua, NI. Julio. 26. 8B-7B.
- Sônia M.; Micheletti F.; de Souza, L.; Valente, E.; de Araújo, M.; da Silva, N.; Gómez, M. 2012. Evaluation of entomopathogenic fungi as biological control agents *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). 30: 1. 93-99 IDESIA (Chile)
- Steinhaus, E. 1956. Microbial Control-The Emergence of an Idea. A Brief History of Insect Pathology through the Nineteenth Century. University of California. Berkeley California. *Hilgardia*.26: 2. 107-157.
- Suárez, M.; Méndez, L.; Valdez, M.; De Moura, R.; Dos Reis, A.; Vargas, N.; Ascanio, E. 2007. Control de las infestaciones de la garrapata *Boophilus microplus* en la ganadería Cubana y en regiones de Latinoamérica con la aplicación del inmunógeno Gavac® dentro de un programa de lucha integral. *Redectopar*. Red Electrónica de Garrapatas y Enfermedades Transmitidas por Garrapatas para América Latina y el Caribe. Red Ectopar. Disponible en: <http://www.corpoica.org.co/redectopar/redectopar.asp>.
- Sung, G.; Hywel, N.; Mo Sung, J.; Luangsa, J.; Shrestha, B.; Spatafora, J. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57: 5–59.
- Téllez, A.; Cruz, M.; Mercado, Y.; Asaff, A.; Arana, A. 2009. Mecanismos de Acción y Respuesta en la Relación de Hongos Entomopatógenos e Insectos. *Revista Mexicana de Micología*. 30:73-80.
- Villegas, F. 2011. Hongos entomopatógenos para el control del Psílido de la papa *Bactericera cockerelli* (Sulc) Hemiptera: Triozidae y su identificación molecular. Tesis. Maestra en Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Agronomía. San Luis potosí. MX. 31 p.
- Villar, C. 2012. El parasitismo en bovinos y el cambio climático en países tropicales con énfasis en investigaciones de Colombia. *Sitio argentino de producción animal*. 7 p. Disponible en <http://www.produccion-animal.com.ar>.
- Vuillemin, P. 1912. *Beauveria*, Nouveau genre de Verticilliacées. *Bulletin de la Société Botanique de France*. 59:1:34-40.

Zengzhi, L.; Chunru, L.; Bo, H.; Meizhen, F. 2001. Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomopathogenic fungus. *Chinese Science Bulletin*. 9: 751–753.

Zimmermann, G. 2008. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Science and Technology*. 18.9:865-901.

Zimmermann, G. 2007a. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*. 17: 553-596.

2007b. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*. 17: 879-920.

## VIII. ANEXOS

Anexo 1. Placas estigmáticas (espiráculos) de *R. microplus*.



Fig.1. Vista dorsal de un espécimen muerto de *R. microplus* colonizada por el hongo entomopatógeno *I. fumosorosea*, se observan las placas estigmáticas detrás del cuarto par de patas, estas presentan una forma redonda u ovalada, propio de esta especie (CFSPH The Center for Food Security & Public Health, 2007).

Anexo 2. Análisis de varianza porcentaje de germinación *M. anisopliae*

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F Calculado	p-valor
Modelo	506.10	2	253.05	233.58	<0.0001
Horas	506.10	2	253.05	233.58	<0.0001
Error	13.00	12	1.08		
Total	519.10	14			
Variable N % de germ	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	Coef. Var		
15	0.97	0.97	1.17		

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.75620 Error: 1.0833 Grados de libertad: 12

Anexo 3. Análisis de varianza porcentaje de germinación *C. bassiana*

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F Calculado	p-valor
Modelo	390.83	2	195.42	142.99	<0.0001
Horas	390.83	2	195.42	142.99	<0.0001
Error	16.40	12	1.37		
Total	407.23	14			
Variable N % de germ	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	Coef. Var		
15	0.96	0.95	1.31		

**Test:** Tukey Alfa=0.05 **DMS**=1.97254 **Error:** 1.3667 **Grados de libertad:** 12

Anexo 4. Análisis de varianza porcentaje de germinación *I. fumosorosea*

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F Calculado	p-valor
Modelo	60.83	2	30.42	17.72	<0.0003
Horas	60.83	2	30.42	17.72	<0.0003
Error	20.60	12	1.72		
Total	81.43	14			
Variable N % de germ	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	Coef. Var		
15	0.75	0.70	1.38		

**Test:** Tukey Alfa=0.05 **DMS**=2.21073 **Error:** 1.7167 **Grados de libertad:** 12

Anexo 5. Análisis de varianza % mortalidad Abbott *M. anisopliae*

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F Calculado	p-valor
Modelo	22106.67	5	4421.33	18.68	<0.0001
Horas	22106.67	5	4421.33	18.68	<0.0001
Error	5680.00	24	236.67		
Total	27786.67	29			
Variable N % mortalidad Abbott	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	Coef. Var		
30	0.80	0.75	22.19		

**Test:** Tukey Alfa=0.05 **DMS**=30.08350 **Error:** 236.6667 **Grados de libertad:** 24

Anexo 6. Análisis de varianza % de mortalidad Abbott *C. bassiana*

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F Calculado	p-valor
Modelo	16696.67	5	3339.33	9.19	<0.0001
Horas	16696.67	5	3339.33	9.19	<0.0001
Error	8720.00	24	363.33		
Total	25416.67	29			
Variable N % mort Abbott	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	Coef. Var		
30	0.80	0.75	22.19		

**Test:** Tukey Alfa=0.05 **DMS**=37.27455 **Error:** 363.3333 **Grados de libertad:** 24

Anexo 7. Análisis de varianza % de mortalidad Abbott *I. fumosorosea*

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F Calculado	p-valor
Modelo	11176.67	5	2235.33	5.18	0.0023
Concentración	11176.67	5	2235.33	5.18	0.0023
Error	10360.00	24	431.67		
Total	21536.67	29			
Variable N % garr. parasit	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	Coef. Var		
30	0.52	0.42	55.16		

**Test:** Tukey Alfa=0.05 **DMS**=40.62881 **Error:** 431.6667 **Grados de libertad:** 24

Anexo 8. Análisis de varianza de garrapatas parasitadas por *M. anisopliae*

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F Calculado	p-valor
Modelo	46297.14	6	7716.19	49.55	<0.0001
Concentración	46297.14	6	7716.19	103	<0.0001
Error	4360.00	28	155.71	214	
Total	50657.14	34		120	
Variable N % garr. parasit	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	Coef. Var		
35	0.91	0.90	18.99		

**Test:** Tukey Alfa=0.05 **DMS**=25.03486 **Error:** 155.7143. **Grados de libertad:** 28

Anexo 9. Análisis de varianza de garrapatas parasitadas por *C. bassiana*

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F Calculado</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	20817.14	6	3469.52	29.98	<0.0001
Concentración	20817.14	6	3469.52	29.98	<0.0001
Error	3240.00	28	115.71		
Total	24057.14	34			
<b>Variable N % garr. parasit</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup> Aj</b>	<b>Coef. Var</b>		
35	0.87	0.84	24.29		

**Test:** Tukey Alfa=0.05 **DMS**=21.58114 **Error:** 115.7143. **Grados de libertad:** 28

Anexo 10. Análisis de varianza de garrapatas parasitadas por *I. fumosorosea*

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F Calculado</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	38360.00	6	6393.33	51.44	<0.0001
Concentración	38360.00	6	6393.33	51.44	<0.0001
Error	3480.00	28	124.29		
Total	41840.00	34			
<b>Variable N % garr. parasit</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup> Aj</b>	<b>Coef. Var</b>		
35	0.92	0.90	24.24		

**Test:** Tukey Alfa=0.05 **DMS**=22.36617 **Error:** 124.2857 **Grados de libertad:** 28

Anexo 11. Clasificación taxonómica de *Rhipicephalus microplus*.

División: Eukaryota	Reyno:	Metazoa
	Phylum:	Arthropoda
	Subphylum:	Chelicerata
	Clase:	Arachnida
	Subclase:	Acari
	Superorden:	Parasitiformes
	Orden:	Ixodida
	Superfamilia:	Ixodoidea
	Familia:	Ixodidae
	Subfamilia:	Rhipicephalinae
	Género:	<i>Rhipicephalus</i>
	Subgénero:	<i>Boophilus</i>
	Especie:	<i>microplus</i>
	Nombre binomial:	<i>Rhipicephalus microplus</i>

Fuente: NCBI. (National Center for Biotechnology Information, 2015).

Anexo 12. Clasificación taxonómica de los hongos entomopatógenos usados en los bioensayos.

<b>Clasificación taxonómica de <i>Cordyceps bassiana</i>, <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Isaria fumosorosea</i></b>			
<b>División</b>	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota
<b>Reyno</b>	Fungi	Fungi	Fungi
<b>Subreino</b>	Dicarya	Dicarya	Dicarya
<b>Phylum</b>	Ascomycota	Ascomycota	Ascomycota
<b>Subphylum</b>	Pezizomycotina	Pezizomycotina	Pezizomycotina
<b>Clase</b>	Sordariomycetes	Sordariomycetes	Sordariomycetes
<b>Subclase</b>	Hypocreomycetidae	Hypocreomycetidae	Hypocreomycetidae
<b>Orden</b>	Hypocreales	Hypocreales	Hypocreales
<b>familia</b>	Cordycipitaceae	Clavicipitaceae	Cordycipitaceae
<b>Género</b>	<i>Cordyceps</i> = <i>Beauveria</i>	<i>Metarhizium</i>	<i>Isaria</i> = <i>Paecilomyces</i>
<b>Especie</b>	<i>bassiana</i>	<i>anisopliae</i>	<i>fumosorosea</i>
<b>Nombre binomial</b>	<i>Cordyceps bassiana</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Isaria fumosorosea</i>

Fuente: NCBI. (National Center for Biotechnology Information, 2015).