

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA AGRONEGOCIOS Y  
BIOTECNOLOGÍA  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA**

**TESIS PARA OBTENER  
EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO ZOOTECNISTA**

**PATOGENICIDAD *IN VITRO* DE *Beauveria peruviansis* EN HEMBRAS  
ADULTAS Y HUEVOS DE GARRAPATAS *Rhipicephalus microplus*.**

**Autor (a): Bach. Viviana Alexandra Zumaeta Asenjo**

**Asesores: M. Sc. William Bardales Escalante**

**M. Sc. Segundo Manuel Oliva Cruz**

**CHACHAPOYAS – PERÚ**

**2021**

## **Datos de Asesores**

**M. Sc. William Bardales Escalante**

DNI: N° 00440560

Registro ORCID: N° 0000-0001-9721-9057

<https://orcid.org/0000-0001-9721-9057>

**Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz**

DNI: N° 05374749

Registro ORCID: N° 0000-0002-9670-0970

<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>

**Campo de Investigación y el Desarrollo, según la Organización para la**

**Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE):**

4.00.00 -- Ciencias agrícolas.

1.05.08 – Ciencias del Medio Ambiente

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo de investigación lo dedico principalmente a Dios, por ser el inspirador y darme la fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A mis padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes eh logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy. Ha sido un orgullo y un privilegio de ser su hija, son los mejores padres. A todas las personas que me han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que me abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por bendecirme con la vida, por guiarme a lo largo de mi existencia, por ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

Gracias a mis padres: Marlith Asenjo Lozada y Ascensión Zumaeta Ángeles; por ser los principales promotores de mis sueños, por confiar y creer en mis expectativas, por los consejos, valores y principios que me han inculcado.

Agradezco a mis docentes de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, por haberme compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de mi profesión.

A M. Sc. William Bardales Escalante y M. Sc. Segundo Manuel Oliva Cruz asesores de mi proyecto de investigación quienes han guiado con su paciencia, y su rectitud como docente, para hacer posible esta investigación.

Y al Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES), por haberme apoyado en la producción y conservación de *Beauveria peruviansis*.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ  
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI

**Rector**

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÒN

**Vicerrector Académico**

Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN

**Vicerrectora de Investigación**

M. Sc. NILTON LUIS MURGA VALDERRAMA


**Decano(e) de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología**

**VISTO BUENO DE LOS ASESORES DE TESIS PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL**

Los que suscriben el presente, docentes de la UNTRM, hacen constar que han asesorado la realización de la tesis titulada “**PATOGENICIDAD *IN VITRO* DE *Beauveria peruviansis* EN HEMBRAS ADULTAS Y HUEVOS DE GARRAPATAS *Rhipicephalus microplus*” de la bachillera en Ingeniería Zootecnista **VIVIANA ALEXANDRA ZUMAETA ASENJO**.**

Los suscritos dan el visto bueno a la tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el jurado evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de las observaciones que formulen en acta conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas 7 abril de 2021



.....  
**M. Sc. William Bardales Escalante.**  
ASESOR



.....  
**M. Sc. Segundo Manuel Oliva Cruz**  
ASESOR

**JURADO EVALUADOR**



---

Ph. D. Ives Julian Yoplac Tafur  
**PRESIDENTE**



---

Dr. Raúl Rabanal Oyarce  
**SECRETARIO**



---

M.Sc. Nugo Frias Torres  
**VOCAL**



**ANEXO 3-0**

**CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL**

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

*"Patogenicidad in vitro de Beauveria peruviana en hembras adultas y huevos de garrapatas Rhipicephalus microplus"*

presentada por el estudiante ( ) egresado (X) *Bach. Viviana Alexandra Zumaeta Asenjo*

de la Escuela Profesional de *Ingeniería Zootecnista*

con correo electrónico institucional *7443438951@untrm.edu.pe*

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- a) La citada Tesis tiene *13* % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (X) / igual ( ) al 25 % de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- b) La citada Tesis tiene ..... % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, *18* de *noviembre* del *2021*

*[Signature]*  
SECRETARIO

*[Signature]*  
VOCAL

*[Signature]*  
PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....  
.....





ANEXO 3-Q

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 09 de diciembre del año 2021, siendo las 15:00 horas, el aspirante: Bach. Viviana Alexandra Zumaeta Asenjo defiende en sesión pública presencial ( ) / a distancia ( ) la Tesis titulada: "Patogenicidad in vitro de Beauveria peruviana en hembras adultas y huevos de garrapatas Rhipicephalus micro plus", teniendo como asesor a M.Sc. William Bardales Escalante, M.Sc. Manuel Oliva Cruz, para obtener el Título Profesional de Ingeniero Zootecnista, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: Ph.D. Ives Julian Yoplac Tafur

Secretario: Dr. Raúl Rabanal Oyarce

Vocal: M.Sc. Hugo Frias Torres



Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado ( X ) Desaprobado ( )

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 16:10 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

[Signature] SECRETARIO

[Signature] VOCAL

[Signature] PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....

## ÍNDICE

RESUMEN .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
I. INTRODUCCIÓN .....	14
II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
2.1. Muestras y lugar de estudio.....	17
2.2. Manejo de las garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	17
2.3. Producción de huevos .....	17
2.4. Preparación de la solución de hongo <i>Beauveria peruviansis</i> .....	18
2.5. Bioensayo 1: Patogenicidad in vitro de la <i>Beauveria peruviansis</i> en garrapatas teleoginas.....	20
2.6. Bioensayo 2: Patogenicidad in vitro de la <i>Beauveria peruviansis</i> en huevos de garrapatas producidos in vitro.....	21
2.7. Diseño estadístico .....	21
2.7.1. Bioensayo 1 .....	21
2.7.2. Bioensayo 2 .....	21
III. RESULTADOS .....	23
3.1. Bioensayo N°1: Evaluación de la patogenicidad in vitro de la cepa nativa del hongo <i>Beauveria peruviansis</i> en garrapatas teleoginas de <i>Rhipicephalus microplus</i> colectadas de ganado bovino de la zona tropical de la región Amazonas	23
3.1.1. Mortalidad de teleoginas.....	23
3.1.2. Efecto del hongo <i>Beauveria peruviansis</i> sobre la inhibición de la ovoposición .....	28
3.1.3. Efecto del hongo <i>Beauveria peruviansis</i> sobre peso de huevos (gr).....	31
3.2. Bioensayo N°2: Evaluación de la patogenicidad in vitro de la cepa nativa del hongo <i>Beauveria peruviansis</i> sobre huevos de garrapatas <i>Rhipicephalus</i> <i>microplus</i> producidos en laboratorio .....	32
IV. DISCUSIÓN .....	36
V. CONCLUSIONES .....	38
VI. RECOMENDACIONES .....	39
VII. BIBLIOGRAFÍA .....	40
VIII. ANEXOS.....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 01:</b> Distribución de los tratamientos utilizados en el ensayo I .....	21
<b>Tabla 02:</b> Distribución de los tratamientos utilizados en el ensayo II.....	22
<b>Tabla 03:</b> Causa de muertes de <i>Rhipicephalus microplus</i> teleoginas .....	24
<b>Tabla 04:</b> Tabla de análisis de varianza de resumen sobre mortalidad de <i>Rhipicephalus microplus</i> teleoginas .....	26
<b>Tabla 05:</b> Prueba de Dunnett en mortalidad de garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i> teleoginas .....	27
<b>Tabla 06:</b> Efecto del hongo <i>Beauveria peruviansis</i> sobre la inhibición de la ovoposición en <i>Rhipicephalus microplus</i> teleoginas .....	28
<b>Tabla 07:</b> Tabla de análisis de varianza de resumen sobre ovoposición de <i>Rhipicephalus microplus</i> teleoginas .....	29
<b>Tabla 08:</b> Prueba de Dunnett en ovoposición de <i>Rhipicephalus microplus</i> teleoginas .....	30
<b>Tabla 09:</b> Peso de huevos (gr) por ovoposición y diferencias de peso (gr) de huevos (Testigo vs Tratamientos) de <i>Rhipicephalus microplus</i> teleoginas sometidas al efecto de hongo <i>Beauveria peruviansis</i> .....	31
<b>Tabla 10:</b> Tabla de análisis de varianza de resumen sobre peso de huevos de <i>Rhipicephalus microplus</i> teleoginas .....	32
<b>Tabla 11:</b> Prueba de Dunnett en peso de huevos de <i>Rhipicephalus microplus</i> teleoginas .....	33
<b>Tabla 12:</b> Efecto del hongo <i>Beauveria peruviansis</i> sobre huevos de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	34
<b>Tabla 13:</b> Tabla de análisis de varianza de resumen sobre eclosión de huevos de <i>Rhipicephalus microplus</i> teleoginas. ....	34
<b>Tabla 14:</b> Prueba de Dunnett en eclosión de huevos de <i>Rhipicephalus microplus</i> teleoginas. ....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 01:</b> Producción de huevos de <i>Rhipicephalus microplus in vitro</i> .....	18
<b>Figura 02:</b> Hongo <i>Beauveria peruviansis</i> activado y esporulado en PDA.....	19
<b>Figura 03:</b> Inoculación de sustrato de arroz con <i>Beauveria peruviansis</i> .....	19
<b>Figura 04:</b> Porcentaje de cada causa de muertes de <i>Rhipicephalus microplus</i> teleoginas utilizadas en el bioensayo 1 .....	25
<b>Figura 05:</b> Porcentaje de eficacia de los tratamientos en la mortalidad de <i>Rhipicephalus microplus</i> teleoginas .....	26
<b>Figura 06:</b> Numero de garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i> muertas por tratamiento.	27
<b>Figura 07:</b> Porcentaje de garrapatas que ovoposicionarón de los tratamientos con <i>Beauveria peruviansis</i> y testigo.....	29
<b>Figura 08:</b> Peso promedio (gramos) de huevos por ovoposición de <i>Rhipicephalus microplus</i> teleoginas .....	31
<b>Figura 09:</b> Peso de huevos de <i>Rhipicephalus microplus</i> teleoginas .....	32
<b>Figura 10:</b> Preparación de PDA .....	46
<b>Figura 11:</b> Reactivación de hongo <i>Beauveria peruviansis</i> en la cámara de flujo de aire laminar e incubación .....	46
<b>Figura 12:</b> Preparación de sustrato de arroz .....	47
<b>Figura 13:</b> Inoculación del sustrato de arroz con <i>Beauveria peruviansis</i> en la cámara de flujo de aire laminar e incubación.....	48
<b>Figura 14:</b> Lavado y desinfección de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	49
<b>Figura 15:</b> Preparación de la suspensión de conidios de hongo <i>Beauveria peruviansis</i> .....	49
<b>Figura 16:</b> Inoculación de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	50
<b>Figura 17:</b> Distribución de los tratamientos en estudio .....	50
<b>Figura 18:</b> Colonización de <i>Beauveria peruviansis</i> en <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	51
<b>Figura 19:</b> laceraciones ocasionadas por <i>Beauveria peruviansis</i> en <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	51
<b>Figura 20:</b> Pesado de huevos de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	52
<b>Figura 21:</b> Inoculación de huevos de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	52
<b>Figura 22:</b> Observación y conteo en estereoscopio de huevos no eclosionados y ninfas de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	53
<b>Figura 23:</b> Colonización de <i>Beauveria peruviansis</i> en huevos <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	53

## RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de evaluar la patogenicidad *in vitro* del hongo *Beauveria peruviansis* sobre garrapatas *Rhipicephalus microplus* en estadio de teleoginas y huevos. Las *Rhipicephalus microplus* fueron colectadas de hatos ganaderos infestados del distrito de Lonya Grande provincia de Utcubamba. Se realizaron 02 bioensayos con dos estadios: teleoginas y huevos que fueron cultivadas en laboratorio. Los dos bioensayos se sometieron a tratamientos con soluciones del hongo *Beauveria peruviansis* en concentraciones de  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^7$  conidios / mL, donde se evaluó la mortalidad de teleoginas, inhibición de la ovoposición e inhibición de la eclosión de huevos. Los resultados del bioensayo 1, se obtuvo una mortalidad de 92%, 80% y 64%; la inhibición de la ovoposición fue del 60%, 32% y 16% con los tratamientos  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^7$  conidios / mL respectivamente. La inhibición de la eclosión de los huevos producidos en laboratorio (Bioensayo 2) fue de 76.050%, 62.536% y 74.784% con los tratamientos  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^7$  conidios / mL. La concentración de *Beauveria peruviansis* de  $1 \times 10^9$  conidios / mL, es la que más patogenicidad ocasiona en la garrapatas *Rhipicephalus microplus*; en sus diferentes estadios. La prueba de Dunnet nos indica que todos los tratamientos muestran una diferencia significativa con el testigo, empleando un nivel de confianza del 99.95%.

**Palabras clave:** Patogenicidad, *Rhipicephalus microplus*, conidios, oviposición, *Beauveria peruviansis*, *in vitro*, concentraciones.

## ABSTRACT

The present investigation was carried out with the objective of evaluating the in vitro pathogenicity of the *Beauveria peruviansis* fungus on *Rhipicephalus microplus* ticks in the teleogin stage and eggs. The *Rhipicephalus microplus* were collected from infested cattle herds in the Lonya Grande district, Utcubamba province. Two two-stage bioassays were carried out: teleogynes and eggs that were cultured in the laboratory. The two bioassays were subjected to treatments with solutions of the *Beauveria peruviansis* fungus at concentrations of  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$  and  $1 \times 10^7$  conidia / mL, where the mortality of teleogines, inhibition of ovoposition and inhibition of egg hatching were evaluated. The results of bioassay 1, a mortality of 92%, 80% and 64% was obtained; the inhibition of oviposition was 60%, 32% and 16% with the treatments  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$  and  $1 \times 10^7$  conidia / mL respectively. The hatching inhibition of the eggs produced in the laboratory (Bioassay 2) was 76.050%, 62.536% and 74.784% with the treatments conidia / mL.  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$  and  $1 \times 10^7$ . Dunnet's test indicates that all treatments show a significant difference with the control, using a confidence level of 99.95%.

**Key words:** Pathogenicity, *Rhipicephalus microplus*, conidia, oviposition, *Beauveria peruviansis*, in vitro, concentration.

## I. INTRODUCCIÓN

La ganadería bovina es una importante actividad económica en el mundo y en el Perú, que representa el 3.2% VBP (MINAGRI, 2017), involucrando a pequeños productores. Esta actividad se realiza en todos los departamentos del país; destacando dentro de ellos lugares con condiciones climáticas de trópico, como la región de Amazonas, San Martín, Ucayali, Loreto y Huánuco; donde se encuentra el 11.18% de la población (INEI, 1994). Las garrapatas son el principal problema de la ganadería tropical y subtropical, ya que son transmisores de agentes patógenos causante de piroplasmosis y anaplasmosis, llegando a causar hasta la muerte de los animales. *Rhipicephalus microplus* (anteriormente *Boophilus microplus*) es la garrapata que tiene un mayor impacto económico en México, Centroamérica, Suramérica y Australia, donde las pérdidas económicas se reflejan en la baja ganancia de peso, daño en las pieles, disminución de la producción de carne y leche, y en la transmisión de enfermedades zoonóticas (Echevarry & Osorio, 2016).

El principal método de control de la garrapatosis, es el control químico a base de cipermetrinas, ivermectinas, organofosforados, entre otros; que con el paso del tiempo los parásitos han generado resistencia. Los métodos de control químico además de la resistencia del parásito mismo, traen consigo peligros para la salud de las personas, animales y del ambiente; lo que abre paso a utilizar métodos alternativos de control, dentro de ellos el control biológico. El control biológico fue concebido a inicios del siglo XIX cuando algunos naturistas de diferentes países reseñaron el importante papel de los organismos entomófagos en la naturaleza y con el empleo de estos controladores biológicos se intenta restablecer el perturbado equilibrio ecológico, mediante la utilización de organismos vivos para eliminar o reducir los daños causados por organismos perjudiciales, actualmente se desarrollan agentes de control biológico, organismos vivos como hongos, bacterias, virus e insectos que reducen la población de insectos y enfermedades, sin dañar el medio ambiente y la salud (Guédez, *et al.*, 2008).

El control biológico mediante el uso de hongos entomopatógenos ha demostrado ser una alternativa promisoriosa y económicamente prometedora para el control de garrapatas en los bovinos. Los hongos entomopatógenos, destacan como una alternativa de control biológico de garrapatas en la ganadería bovina gracias a su amplia distribución natural, bajo riesgo para la salud de humanos y animales, compatibilidad ambiental, alta virulencia sobre garrapatas y bajo costo. Los hongos del género de *Beauveria* en los

últimos años se están usando como controladores biológicos efectivos de muchas plagas, entre ellas las garrapatas y no tiene los problemas asociados con el uso de productos químicos (Fernández, 2006).

El género *Beauveria* se considera un género de hongos cosmopolita anamórfico y teleomórfico transmitidos por el suelo, patógenos de artrópodos que incluye especies ecológicas y económicamente importantes (Bustamante, *et. al.*, 2019).

El control biológico de garrapatas en la ganadería bovina con el uso de hongos entomopatógenos del género *Beauveria*, es una práctica sanitaria que viene desarrollándose como una alternativa al control químico de los ixodídeos y con lo cual se está contribuyendo a reducir la resistencia que viene generando los tratamientos con productos químicos. El mecanismo específico de acción de los hongos entomopatógenos es principalmente por contacto, el hongo es capaz de penetrar dentro del insecto e invadirlo, provocándole la muerte (Delgadillo *et al.*, 2007).

La enfermedad producida por el hongo se la conoce como micosis, la cual se desarrolla en 3 fases; la primera es la adherencia y germinación del hongo, las esporas que germinan forman un tubo germinativo el cual funciona como una hifa de penetración de la cutícula, además infecta a las garrapatas a través de la abertura corporales como son cavidad bucal y ano; la segunda fase es la penetración por parte de las hifas gracias a la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica ejercida por el tubo germinativo; y por último comienza el desarrollo del hongo que resulta en la muerte de la garrapata (Pucheta, 2006).

El hongo *Beauveria peruviana* es un hongo entomopatógeno descubierto a partir del análisis de una serie de especies de hongos del género *Beauveria*, aislados de cepas fúngicas de barrenadores de café infectados (*Hypothenemus hampei*) obtenidos de bayas de café infectadas en los cafetales en el noreste de Perú (Provincia de Rodríguez de Mendoza, departamento de Amazonas), en base a observaciones morfológicas, inferencias filogenéticas y métodos de delimitación de especies de ADN. La clasificación taxonómica de *Beauveria peruviana*, corresponde al Reino: Fungi, Clase: Sordariomycetes, Familia: Clavicipitaceae, Género: *Beauveria* (Instituto de Investigación de Sanidad Vegetal, 1998), Especie: *Beauveria peruviana* (Oliva Cruz, 2019).

El trabajo de investigación inicio con la colecta de las garrapatas *Rhipicephalus microplus* en hatos ganaderos infestados del distrito de Lonya Grande provincia de Utcubamba, sin tratamiento químico o biológico para garrapatas en un periodo mínimo de un mes, luego



fueron trasladadas al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias de Animales Domésticos (LABISAN) perteneciente a la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, que se encuentra en la provincia y distrito de Chachapoyas para el desarrollo de todo el proceso de investigación. Para realizar la inoculación de las garrapatas previamente se hizo la desinfección y selección de estas. El hongo *Beauveria peruviansis* se preparó en las concentraciones  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^7$  conidios / ml y fue colocado en vasos beaker, las inoculaciones se realizó por el método de inmersión (se sumergió las garrapatas por un periodo de 3 minutos), las muestras fueron mantenidas en incubación a temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  y observadas por un periodo de 7 días para el bioensayo 1 para la inoculación de huevos se realizó el mismo método de inmersión, las observaciones fueron durante 30 días seguidos.

El presente trabajo de investigación, tiene como objetivo evaluar la patogenicidad de *Beauveria peruviansis* en el control de garrapatas *Rhipicephalus microplus*, considerando la necesidad de desarrollar mecanismos de control biológico de la garrapata (*Rhipicephalus microplus*) en los hatos ganaderos del país, logrando contribuir a la mejora económica de las familias, brindándoles la sostenibilidad productiva y reproductiva a través del tiempo.

## **II. MATERIA Y MÉTODOS**

### **2.1. Muestras y lugar de estudio**

En el presente trabajo de investigación se colectaron garrapatas *Rhipicephalus microplus* adultas de ganado bovino infestados, ubicados en hatos ganaderos del distrito de Lonya Grande. Los animales a los cuales se colectaron las garrapatas no recibieron control químico ni biológico en un periodo mínimo de 30 días. El mecanismo de retiro de las garrapatas se realizó con el uso de pinzas que evitaron lesionar a la misma a fin de garantizar su viabilidad.

El hongo *Beauveria peruviansis* fue proporcionado por el Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES).

### **2.2. Manejo de las garrapatas *Rhipicephalus microplus*.**

Las garrapatas colectadas fueron colocadas en tapers ventilados y trasladadas al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias de Animales Domésticos (PROSAN) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ubicado en la provincia y distrito de Chachapoyas.

En laboratorio se seleccionaron garrapatas mayores a 4 milímetros para el bioensayo de mortalidad de teleoginas e inhibición de la ovoposición y otro grupo para la producción de huevos. El tamaño de las teleoginas se consideró según López *et al.* (2009).

### **2.3. Producción de huevos**

Los huevos de *Rhipicephalus microplus* se produjeron en condiciones de laboratorio a partir de 25 garrapatas teleoginas, con la finalidad de realizar el bioensayo de evaluación de la patogenicidad en huevos. Las garrapatas seleccionadas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0,5% antes de ponerlas en incubación.

La producción de huevos se realizó en 5 placas que contenían 5 teleoginas cada una, que fueron llevadas a incubación por un periodo de 7 días a una temperatura de 28 °C, con una humedad relativa al 85%. En el día siete (07) de incubación se obtuvo la totalidad de ovoposición que inicio en el día tres (3), como resultado se obtuvo pequeñas masas de huevos (Figura 01) las cuales fueron pesadas para formar grupos de 0.1 gr.

## Figura 1

Producción de huevos de *Rhipicephalus microplus* *in vitro*



### 2.4. Preparación de la solución de hongo *Beauveria peruviansis*.

Para la activación del hongo se realizó la siembra del hongo *Beauveria peruviansis* en medio nutritivo agar papa dextrosa (APD) e incubación a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , durante 20 días. Con las esporas obtenidas de la cepa en el medio APD (Figura 02), se realizó una nueva siembra en 6 bolsas plástica de polipropileno que contenían arroz pre-cocido (Figura 3), se amarro, esterilizo y luego se incubaron durante 20 días a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  (Requejo, 2019).

Una vez que esporularon las cepas sobre el arroz, se determinó la concentración de esporas con ayuda de la metodología de Cañedo & Ames (2004), para lo cual se preparó una dilución seriada con el hongo *Beauveria peruviansis* en concentraciones de:  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  conidios/ml, de acuerdo a las formulas empleadas se determinó la cantidad de esporas (gr) y el volumen (mililitros) de agua destilada para las distintas concentraciones. Las concentraciones se determinaron considerando antecedentes de investigaciones realizadas en el de control de garrapatas con otras especies o géneros de hongos entomopatógeno (Angelo *et al.* 2009).

**Figura 2**

Hongo *Beauveria peruviansis* activado y esporulado en PDA



**Figura 3**

Inoculación de sustrato de arroz con *Beauveria peruviansis*.



## **2.5. Bioensayo 1: Patogenicidad *in vitro* de la *Beauveria peruviana* en garrapatas teleoginas.**

La prueba de patogenicidad en el laboratorio se siguió el procedimiento descrito por González *et al.* (1993):

- a) Se tomaron las garrapatas en estado de teleoginas, seleccionadas para este bioensayo y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0,5%, sumergiéndolas durante 3 minutos, luego se lavaron 3 veces con agua destilada estéril (ADE) y posteriormente se formaron 04 grupos de 25 garrapatas para cada uno de los tratamientos: T1 ( $1 \times 10^7$ , conidios/ml), T2 ( $1 \times 10^8$  conidios/ml), T3 ( $1 \times 10^9$  conidios/ml) y Tratamiento testigo (agua destilada).
- b) Las garrapatas se inocularon por inmersión durante 3 minutos en vasos beaker que contenían 50 ml de solución de cada una de las concentraciones preparadas, T1 ( $1 \times 10^7$ , conidios/ml), T2 ( $1 \times 10^8$  conidios/ml), T3 ( $1 \times 10^9$  conidios/ml) y los individuos del tratamiento testigo en agua destilada. Luego con ayuda de una pinza se distribuyeron las 25 garrapatas de cada tratamiento en 5 placas petri de cristal de 90 mm de diámetro, previamente esterilizadas y acondicionadas con papel filtro humedecido, por cada tratamiento (5 individuos por placa) y se procedió a identificarlas con el código de la concentración y el nombre de cada bioensayo. Para el tratamiento testigo las garrapatas se colocaron en una solución de agua destilada estéril y se procedió a distribuir las 25 garrapatas en 5 placas petri (5 individuos por placa). Las muestras fueron colocadas en la incubadora a una temperatura de 28°C y se realizó una observación diaria hasta la mortalidad de todos los individuos, la cual se alcanzó a los 6 días post inoculación.

## 2.6. Bioensayo 2: Patogenicidad *in vitro* de la *Beauveria peruviansis* en huevos de garrapatas producidos *in vitro*.

Los huevos producidos en laboratorio fueron pesados para formar masas de 0.1 gr, formando 20 masas. Cada masa de 0.1 gr tiene un aproximado de 2096 a 2222 huevos. Los huevos fueron inoculados por método de inmersión, en placas Petri descartables de 35 mm que contenían la solución de cada tratamiento ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  conidios/ml y Tratamiento testigo), luego se procedió a sumergir cada masa de huevos por 3 minutos, pasado ese lapso de tiempo con ayuda de una espátula se retiró los huevos y fueron transferidas a cada placa petri de vidrio esterilizada, las que tenían en el fondo papel filtro estéril y humedecido con agua destilada estéril. Posteriormente se procedió a identificarlas con el código de la concentración y el nombre de cada bioensayo. Para el testigo se realizó la misma metodología, pero usando una solución de agua destilada estéril. Las muestras fueron colocadas en la incubadora a una temperatura de 28°C y se hizo una observación diaria durante 30 días post inoculación a la misma hora, evaluando la presencia de larvas.

## 2.7. Diseño estadístico

### 2.7.1. Bioensayo 1:

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con cuatro (4) tratamientos incluidos el testigo (Tabla 01), con cinco (5) repeticiones por tratamiento y cinco (5) submuestras o unidades experimentales por repetición. La unidad experimental correspondió a una garrapata teleogina. Las variables respuestas evaluadas fueron mortalidad de garrapatas teleoginas e índices reproductivos en las garrapatas teleoginas (inhibición de ovoposición y peso de huevos). Para la evaluación de los análisis estadísticos y grafico de datos se aplico la prueba de Dunnet mediante el software R.

**Tabla 1.** Distribución de los tratamientos utilizados en el ensayo I

Tratamientos	Descripción
T <sub>0</sub>	Testigo (agua destilada estéril)
T <sub>1</sub>	$10^7$ conídias /ml
T <sub>2</sub>	$10^8$ conídias /ml
T <sub>3</sub>	$10^9$ conídias /ml

### 2.7.2. Bioensayo 2:

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con cuatro (4) tratamientos incluidos el testigo (Tabla 02), con cinco (5) repeticiones por tratamiento y cinco (5) sub-muestras o unidades experimentales por repetición. La unidad experimental correspondió a 0.1g de huevos. Las variables respuestas evaluadas fueron porcentaje de huevos eclosionados y no eclosionados. Para la evaluación de los análisis estadísticos y grafico de datos se aplico la prueba de Dunnet mediante el software R.

**Tabla 2.** Distribución de los tratamientos utilizados en el ensayo II

<b>Tratamientos</b>	<b>Descripción</b>
T <sub>0</sub>	Testigo (agua destilada estéril)
T <sub>1</sub>	10 <sup>7</sup> conídias /ml
T <sub>2</sub>	10 <sup>8</sup> conídias /ml
T <sub>3</sub>	10 <sup>9</sup> conídias /ml

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Bioensayo N° 1: Evaluación de la patogenicidad in vitro de la cepa nativa del hongo *Beauveria peruviansis* en garrapatas teleoginas de *Rhipicephalus microplus* colectadas de ganado bovino de la zona tropical de la región Amazonas.

La mortalidad de las garrapatas adulta se realizó en dos grupos: teleoginas (garrapatas grávidas mayor a 4.00 mm y en garrapatas adultas que no alcanzaron aún la gravidez.

La evaluación por efecto del hongo *Beauveria peruviansis* se realizó diariamente hasta el día 6 post inoculación, en el cual se tuvo la mortalidad de todas las garrapatas en los 03 (tres) tratamientos y en el tratamiento testigo. Se evaluó mortalidad, inhibición de la ovoposición y el peso de los huevos ovopositados por las garrapatas de los tres tratamientos y del tratamiento testigo.

##### 3.1.1. Mortalidad de teleoginas

La diferenciación entre la mortalidad de las garrapatas por efecto de *Beauveria peruviansis* o por causas naturales (ovoposición) u otra causa, se realizó considerando el crecimiento del hongo (crecimiento de hifas) que fueron observadas a simple vista y con ayuda del estereoscopio, las garrapatas por *Beauveria* se vuelve turgentes (o hinchadas), la penetración cuticular del hongo causa agujeros en el cuerpo de las garrapatas expulsando la sangre con la que se alimentó antes de ser capturada.

El porcentaje de mortalidad en cada uno de los tratamientos se calculó mediante la fórmula según SENASA (2014).

$$\% \text{Mortalidad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Donde:

$P_i$  = Población inicial

$P_f$  = Población final

La Eficacia de *Beauveria peruviansis* sobre *Rhipicephalus microplus* teleoginas y garrapatas no teleoginas se utilizó la fórmula de Schneider- Orelli (Campos y Velásquez, 2016).

$$\% \text{Eficacia} = \frac{A - B}{100 - B} \times 100$$

Donde:

A = Mortalidad en el tratamiento

B = Mortalidad en el testigo absoluto



En la tabla 3, se puede observar la mortalidad de las teleoginas por las diferentes causas que se dieron en la investigación y por efecto del hongo *Beauveria peruviansis*.

**Tabla 3.** Causa de muertes de *Rhipicephalus microplus* teleoginas.

Tratamiento	N° Unidades experimentales	N° de garrapatas muertas por H BP	N° de garrapatas muertas por ovoposición	N° de garrapatas muertas por causa desconocida
T <sub>0</sub>	25	00	22	03
T <sub>1</sub> (10 <sup>7</sup> )	25	16	09	00
T <sub>2</sub> (10 <sup>8</sup> )	25	20	05	00
T <sub>3</sub> (10 <sup>9</sup> )	25	23	02	00

En el tratamiento Testigo al día 03 se tuvo la muerte de 3 garrapatas (12%), por razones desconocidas y al día 6 se alcanzó la mortalidad del 88.0% de las garrapatas restantes (22) por la actividad de ovoposición propia de la garrapata.

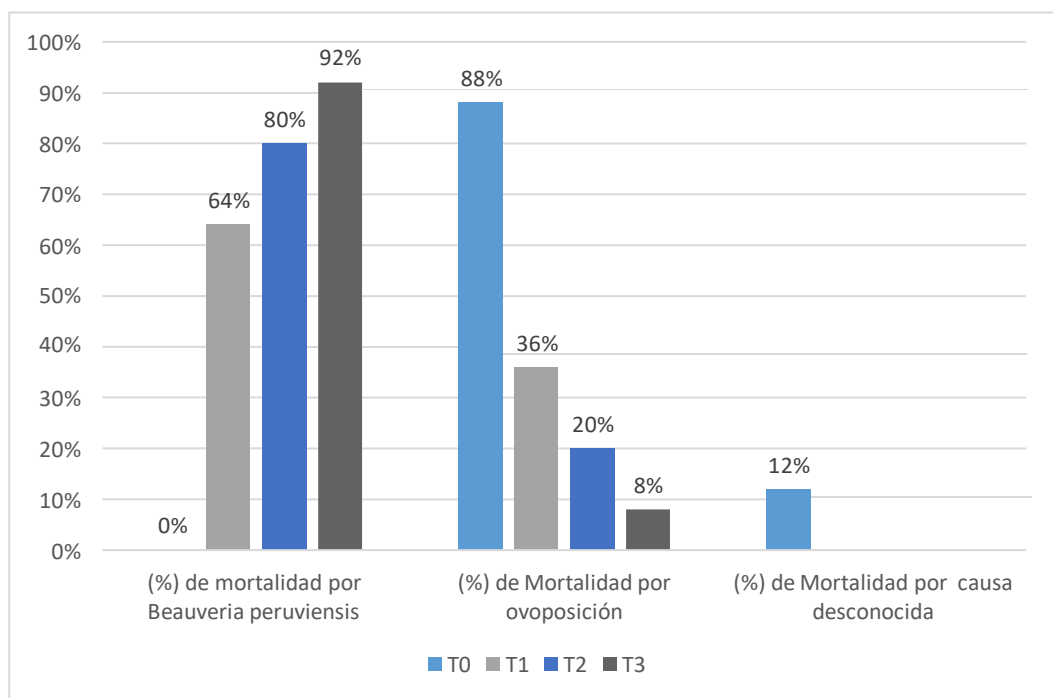
En el tratamiento T1 (10<sup>7</sup> conídias /ml) en el día 5 se tuvo una mortalidad de 32% siendo la mayor de todos los días y en el día 06 murieron el 20.0% de las garrapatas restantes. El 64.0% de las garrapatas murieron con efecto patogénico del hongo *Beauveria peruviansis*; 36.0% murieron después de ovopositar. 16.0% presentaron inhibición de la ovoposición y 48.0% de las garrapatas no lograron completar su ovoposición.

En el tratamiento T2 (10<sup>8</sup> conídias /ml) la mortalidad de las garrapatas inicio el día 04 con 12.0%, logrando una mayor mortalidad de 60% en el día 05. Se obtuvo un 80.0% de garrapatas muertas con efecto patogénico del hongo *Beauveria peruviansis* de las cuales el 12.0% presentaron inhibición total de la ovoposición. El 48.0% de las garrapatas no lograron completar su ovoposición. El 20.0% de garrapatas murieron al completar su ovoposición.

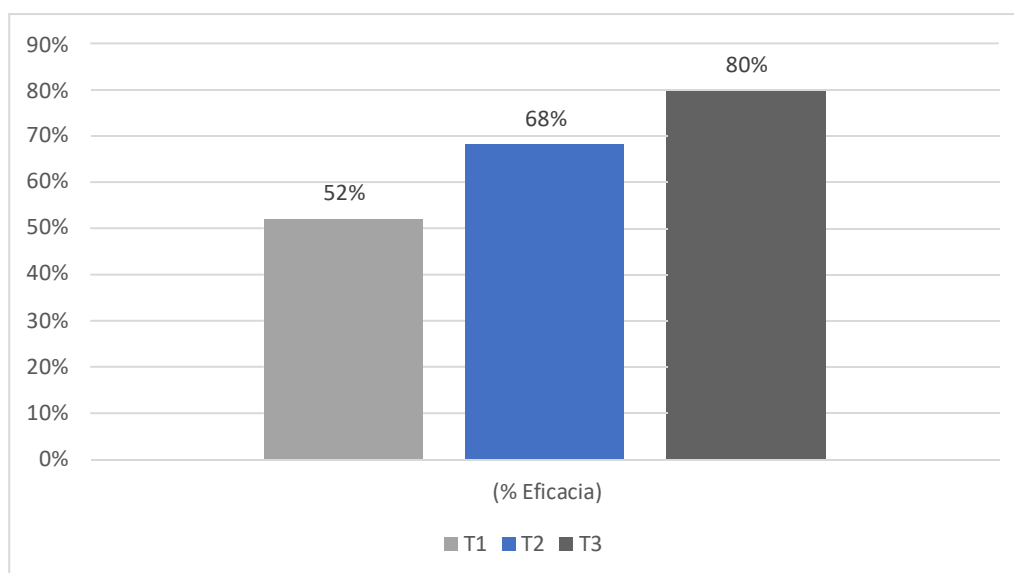
En el tratamiento T3 (10<sup>9</sup> conídias /ml) la mortalidad de las garrapatas inicio el día 04 con un 24%, logrando una mayor mortalidad de garrapatas el día 05 con 60%. Se obtuvo un 92% de garrapatas muertas con efecto patogénico del hongo *Beauveria peruviansis* de las cuales el 60.0% presentaron inhibición de la ovoposición. El 32% de garrapatas

no lograron completar su ovoposición. El 8% de garrapatas murieron al completar su ovoposición.

En la figura 4 se presenta los resultados de mortalidad y en la figura 05 la eficacia del hongo *Beauveria peruviansis* sobre *Rhipicephalus microplus*, donde podemos observar que todos los Tratamientos lograron una mortalidad mayor al 50%, siendo el T3 ( $10^9$  conídias /ml) produjo la mortalidad del 92% de las teleoginas; seguido por el T2 ( $10^8$  conídias /ml) que produjo la mortalidad del 80% de las garrapatas y el T1 ( $10^7$  conídias /ml) con una mortalidad del 64%.



**Figura 4.** Porcentaje de cada causa de muertes de *Rhipicephalus microplus* teleoginas utilizadas en el bioensayo 1.



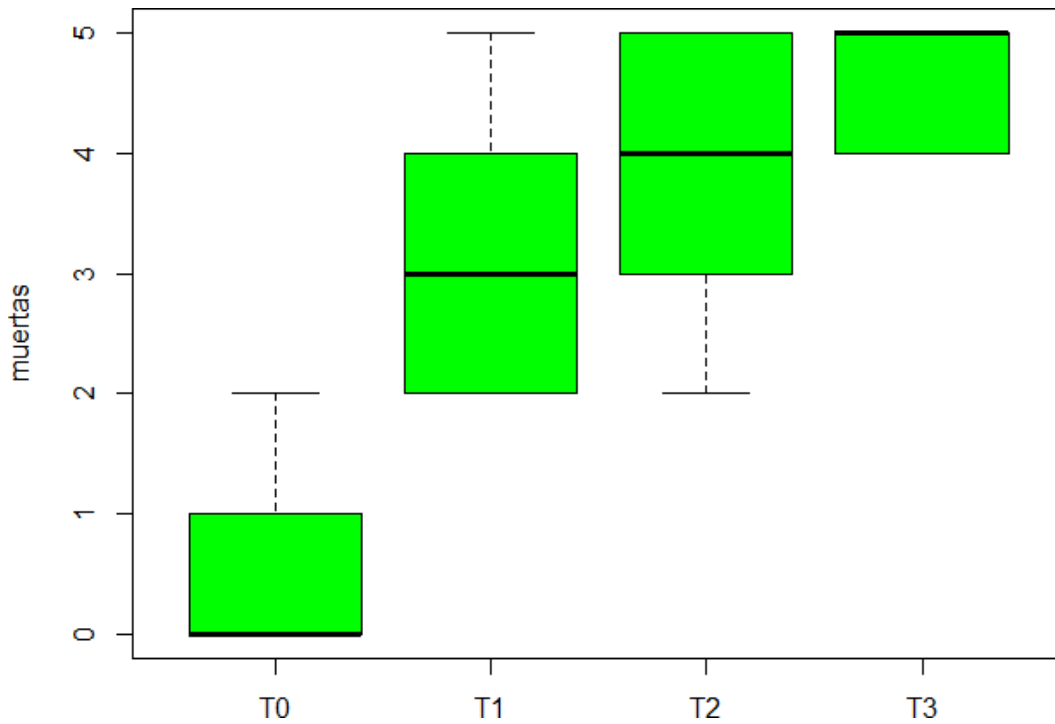
**Figura 5.** Porcentaje de eficacia de los tratamientos en la mortalidad de *Rhipicephalus microplus* teleoginas.

**Tabla 4.** Tabla de análisis de varianza de resumen sobre mortalidad de *Rhipicephalus microplus* teleoginas.

	Df	Sum Sq	Men Sq	F Value	Pr(>F)
<b>Tratamiento</b>	3	44.95	14.983	13.32	0.000129(**)
<b>Residuos</b>	16	18.00	1.125		

\*: Significativo \*\*: Altamente significativo NS: No significativa.

Al evaluar las fuentes de variabilidad ANVA, los tratamientos muestran una diferencia altamente significativos con referencia al testigo. Se trabajó con un  $\alpha$  de 0.05 y se obtuvo un valor de  $p = 0.000129$  por lo tanto se rechaza la  $H_0$  que indica que todos los tratamientos son iguales al testigo.



**Figura 6.** Numero de garrapatas *Rhipicephalus microplus* muertas por tratamiento

**Tabla 5.** Prueba de Dunnett en mortalidad de garrapatas *Rhipicephalus microplus* teleoginas.

Col Mean- Row Mean	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
T <sub>1</sub>	-1.969211 0.0245*		
T <sub>2</sub>	-2.570915 0.0051*	-0.601703 0.2737	
T <sub>3</sub>	-3.336720 0.0004*	-1.367508 0.0857	-0.765804 0.2219

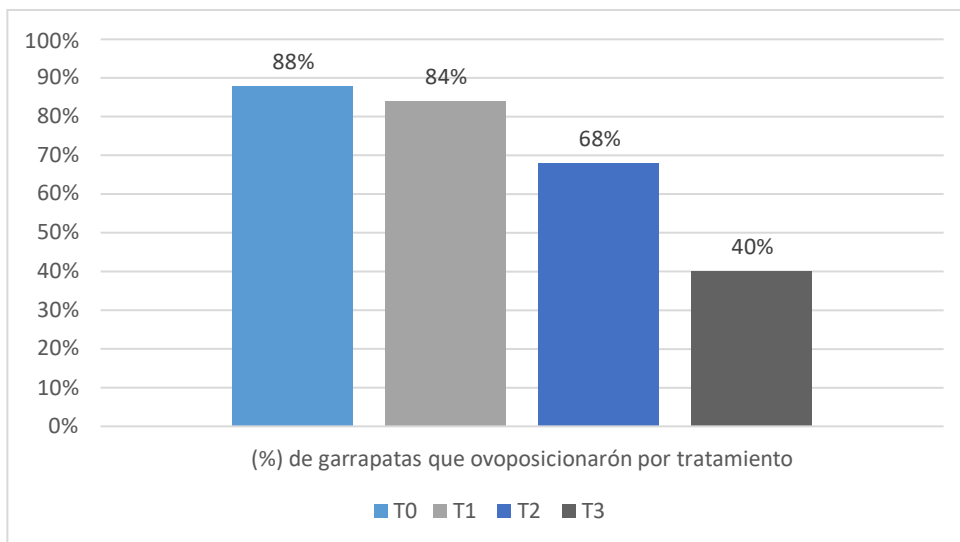
Al evaluar la Prueba Dunnett, observamos que el tratamiento testigo ( $T_0$ ) tiene una diferencia altamente significativa con los tratamientos  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$ , al igual que todos los tratamientos por lo tanto concluimos que todos los tratamientos son significativamente diferentes.

### 3.1.2. Efecto del hongo *Beauveria peruviansis* sobre la inhibición de la ovoposición

Al evaluar el efecto del hongo *Beauveria peruviansis* sobre la inhibición de la ovoposición, se logró que la concentración  $10^9$  conídias /ml reduzca la ovoposición de las teleoginas (Tabla 6) a un 60%, consiguiendo también reducir el peso de los huevos ovopositados (gr) (Tabla 9) en comparación al peso de los huevos de las garrapatas del grupo testigo.

**Tabla 6.** Efecto del hongo *Beauveria peruviansis* sobre la inhibición de la ovoposición en *Rhipicephalus microplus* teleoginas

Tratamiento	Unidades experimentales	Garrapatas que no ovoposicionarón por tratamiento
$T_0$	25	12%
$T_1(10^7)$	25	16%
$T_2(10^8)$	25	32%
$T_3(10^9)$	25	60%



**Figura 7.** Porcentaje de garrapatas que ovopositaron de los tratamientos con *Beauveria peruviansis* y testigo.

**Tabla 7.** Tabla de análisis de varianza de resumen sobre ovoposición de *Rhipicephalus microplus* teleoginas.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
<b>Tratamiento</b>	3	19.35	6.45	4.373	0.0198
<b>Residuos</b>	16	23.60	1.475		

\*: Significativo \*\*: Altamente significativo NS: No significativa.

El análisis de varianza de los resultados nos muestra (ANVA), muestra que los tratamientos tienen una diferencia altamente significativa con respecto al testigo. Se trabajó con un  $\alpha$  de 0.05 y se obtuvo un valor de  $p = 0.0198$  por lo tanto se rechaza la  $H_0$  que indica que todos los tratamientos son iguales al testigo. El coeficiente de variación fue de  $CV=34.21$ .

**Tabla 8.** Prueba de Dunnett en ovoposición de *Rhipicephalus microplus* teleoginas.

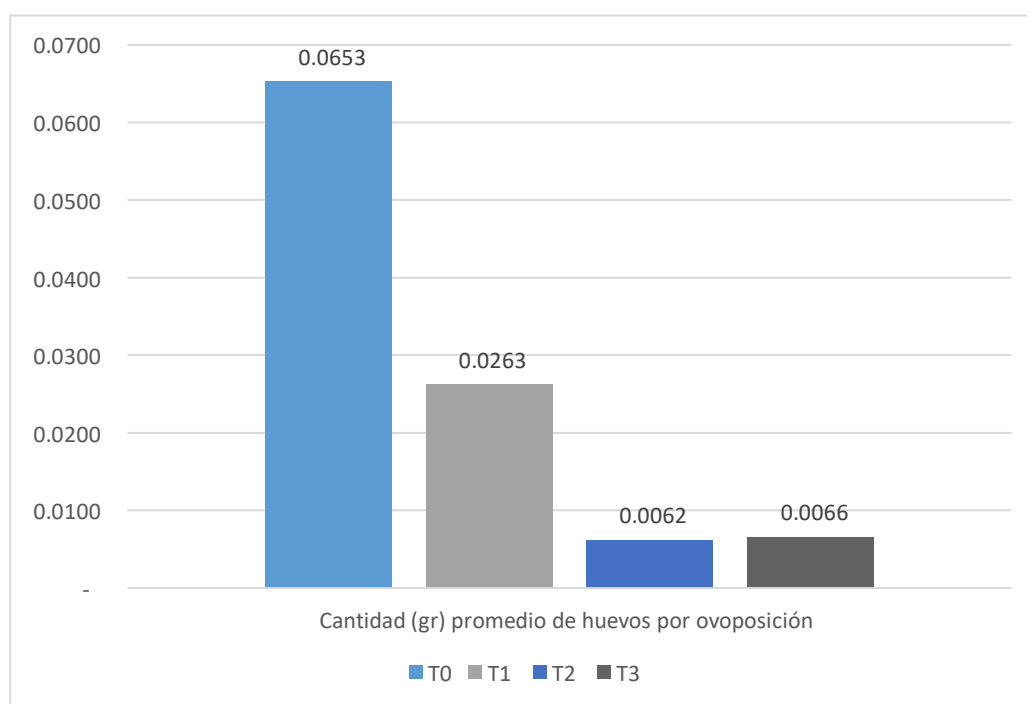
<b>Col Mean- Row Mean</b>	<b>T<sub>0</sub></b>	<b>T<sub>1</sub></b>	<b>T<sub>2</sub></b>
<b>T<sub>1</sub></b>	0.000000 0.5000		
<b>T<sub>2</sub></b>	1.214941 0.1122	1.214941 0.1122	
<b>T<sub>3</sub></b>	2.429883 0.0076*	2.429883 0.0076*	1.214941 0.1122

Los efectos patogénicos de la disminución de la ovoposición de las garrapatas, ocasionados por los tratamientos en base al hongo *Beauveria peruviansis* ( $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ), de acuerdo a la Prueba Dunnett, solamente el tratamiento 3 ( $T_{10^9}$ ) es significativamente diferente a los resultados del tratamiento Testigo ( $T_0$ ). Los resultados de los  $T_1$  y  $T_2$  ( $10^7$ ,  $10^8$ ) son similares a los resultados del grupo testigo. Los resultados del  $T_1$  son similares a los del  $T_2$  pero significativamente diferente con el  $T_3$ .

### 3.1.3. Efecto del hongo *Beauveria peruviansis* sobre peso de huevos (gr)

**Tabla 9.** Peso de huevos (gr) por ovoposición y diferencias de peso (gr) de huevos (Testigo vs Tratamientos) de *Rhipicephalus microplus* teleoginas sometidas al efecto de hongo *Beauveria peruviansis*.

Tratamiento	Peso (gr) promedio de huevos por ovoposición	Diferencias de peso de huevos (testigo vs tto.)
T <sub>0</sub>	0.0653	
T <sub>1</sub>	0.0263	-0.0390
T <sub>2</sub>	0.0062	-0.0591
T <sub>3</sub>	0.0066	-0.0587



**Figura 8.** Peso promedio (gramos) de huevos por ovoposición de *Rhipicephalus microplus* teleoginas.

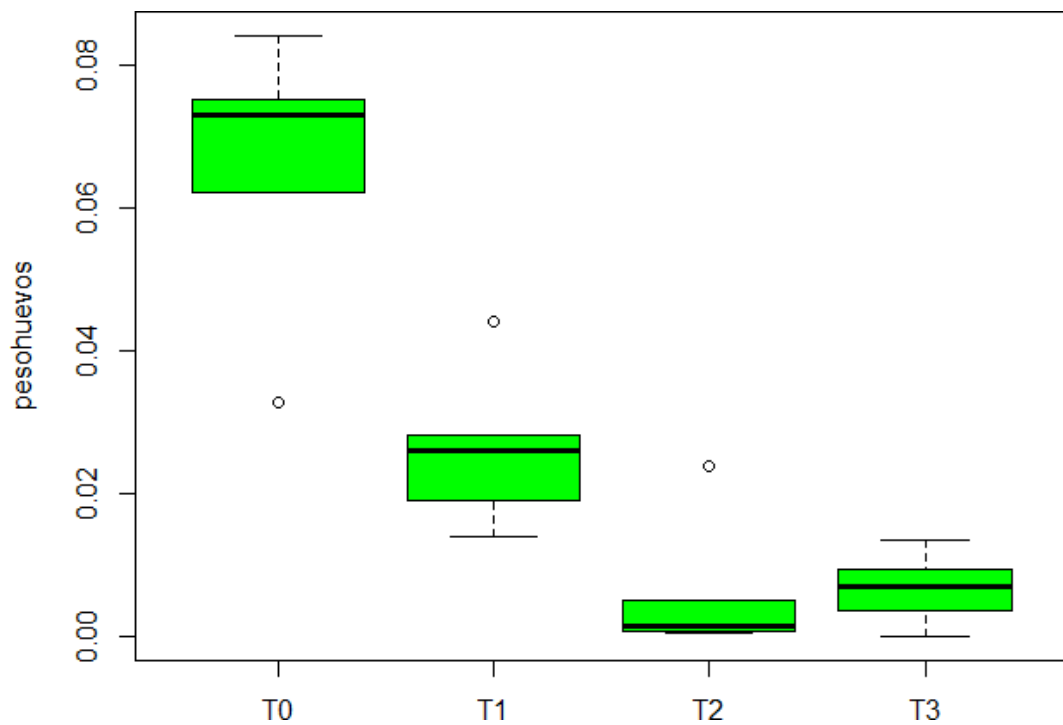


**Tabla 10.** Tabla de análisis de varianza de resumen sobre peso de huevos de *Rhipicephalus microplus* teleoginas.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
<b>Tratamiento</b>	3	0.011571	0.003857	23.77	3.89e-06(***)
<b>Residuos</b>	16	0.002596	0.000162		

\*: Significativo \*\*: Altamente significativo NS: No significativa.

Al evaluar las fuentes de variabilidad ANVA, los tratamientos muestran una diferencia altamente significativos con diferencia al testigo. Se trabajó con un  $\alpha$  de 0.05 y se obtuvo un valor de  $p = 3.89e-06$  por lo tanto se rechaza la  $H_0$  que indica que todos los tratamientos son iguales al testigo.



**Figura 9.** Peso de huevos de *Rhipicephalus microplus* teleoginas.

**Tabla 11.** Prueba de Dunnett en peso de huevos de *Rhipicephalus microplus* teleoginas.

Col Mean- Row Mean	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
T <sub>1</sub>	1.336306 0.0907		
T <sub>2</sub>	3.314039 0.0005*	1.214941 0.0240*	
T <sub>3</sub>	3.153682 0.0008*	2.429883 0.0346	1.214941 0.4363

Al evaluar la Prueba Dunnett, observamos que el tratamiento testigo (T<sub>0</sub>) tiene una diferencia significativa con los tratamientos T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>, mientras que con el T<sub>1</sub> actúan de forma similar, El T<sub>1</sub> es diferente significativamente con el T<sub>2</sub> pero actúa casi similar al T<sub>3</sub>, El tratamiento T<sub>2</sub> actúa similar al T<sub>3</sub>.

### 3.2. Bioensayo N° 2: Evaluación de la patogenicidad in vitro de la cepa nativa del hongo *Beauveria peruviansis* sobre huevos de garrapatas *Rhipicephalus microplus* producidos en laboratorio.

Los tratamientos realizados con el hongo *Beauveria peruviansis* afectaron la eclosión de los huevos de las garrapatas *Rhipicephalus microplus*; siendo el tratamiento de la concentración de *Beauveria peruviansis* de 10<sup>9</sup> conídias /ml, fue la más patogénica en la eclosión de huevo de *Rhipicephalus microplus*, en comparación con los niveles de eclosión de las garrapatas no tratadas. En la tabla 12, se muestra los porcentajes de huevos eclosionados y no eclosionados en los tratamientos realizados y en el grupo Testigo.

**Tabla 12.** Efecto del hongo *Beauveria peruviana* sobre huevos de *Rhipicephalus microplus*

TRATAMIENTO	% de huevos eclosionados	% de huevos no eclosionados
T <sub>0</sub>	85.57%	14.43%
T <sub>1</sub> (10 <sup>7</sup> )	24.71%	75.29%
T <sub>2</sub> (10 <sup>8</sup> )	41.11%	58.89%
T <sub>3</sub> (10 <sup>9</sup> )	23.28%	76.72%

**Tabla 13.** Tabla de análisis de varianza de resumen sobre eclosión de huevos de *Rhipicephalus microplus* teleoginas.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
<b>Tratamiento</b>	3	12160	4053	23.21	4.53e-06(***)
<b>Residuos</b>	16	2794	175		

Al evaluar las fuentes de variabilidad ANVA, los tratamientos muestran una diferencia altamente significativos con diferencia al testigo. Se trabajó con un  $\alpha$  de 0.05 y se obtuvo un valor de  $p = 4.53e-06$  por lo tanto se rechaza la  $H_0$  que indica que todos los tratamientos son iguales al testigo.

**Tabla 14.** Prueba de Dunnett en eclosión de huevos de *Rhipicephalus microplus* teleoginas.

<b>Col Mean- Row Mean</b>	<b>T<sub>0</sub></b>	<b>T<sub>1</sub></b>	<b>T<sub>2</sub></b>
<b>T<sub>1</sub></b>	-2.993325 0.0014*		
<b>T<sub>2</sub></b>	-2.084637 0.0186*	0.908688 0.1818	
<b>T<sub>3</sub></b>	-2.939873 0.0016*	0.053452 0.4787	-0.855235 0.1962

Al evaluar la Prueba Dunnett, observamos que el tratamiento testigo (T<sub>0</sub>) tiene una diferencia altamente significativa con los tratamientos T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>., al igual que todos los tratamientos por lo tanto concluimos que todos los tratamientos son significativamente diferentes.

#### IV. DISCUSIÓN

La patogenicidad del hongo *Beauveria Peruviansis* en las garrapatas teleoginas y huevos de garrapatas en bioensayos en vitro es altamente significativa, considerando que los tratamientos  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  (conídias /ml) ocasionaron la mortalidad del 64%, 80% y 92% de las garrapatas y al mismo tiempo afectaron la ovoposición de las misma. Se han realizado diversas investigaciones con el uso hongos entomopatógenos para el control de garrapatas, como la realizada por Nunes (2019), con *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* a diluciones de  $1 \times 10^7$ ;  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  conidias/ml quien encontró que *M. anisopliae* y *B bassiana* afectaron significativamente en 84 y 77,33%, respectivamente, la mortalidad de las teologinas de *R. microplus*, sin embargo, en un periodo de 14 días. Así mismo, Nunes (2019), encontró que *Metarhizium anisopliae* a la concentración de  $10^9$  conidias/mL produjo un 89,02% de mortalidad lo cual es menor a la mortalidad del 92% producida por *Beauveria Peruviansis* y con una eficacia del 90.9% lo cual es superior al % reportado en dicho estudio. Oporta Lopez (2017), utilizo una dosis  $1 \times 10^7$  conidios/ml, del hongo *Beauveria bassiana*, consiguiendo una mortalidad del 84% a los 20 días, el cual es mayor al 64% de mortalidad ocasionado por *Beauveria Peruviansis* a una misma concentración, sin embargo, el periodo de patogenicidad del hongo BP es mucho más rápido concentrándose la mortalidad en los días 4 y 5. La acción del hongo *Beauveria peruviansis* se debería a mecanismos que tienen los hongos entomopatógenos, como su alta capacidad de acción, alta virulencia, capacidad de adhesión, germinación y penetración de la cutícula y del tracto digestivo del huésped a través de mecanismos físicos y de su habilidad de infectar de una garrapata a otra, y de su capacidad de desarrollarse en la hemolinfa (Álvarez et al. 2017).

La inhibición de la ovoposición es otro de los parámetros estudiados. Las distintas concentraciones de *Beauveria peruviansis*, utilizadas en esta investigación, disminuye hasta un 60% la ovoposición; mientras que en el peso de huevos por ovoposición por teleogina en el tratamiento  $1 \times 10^9$  conidios/ml hubo una diferencia del 91% con el testigo. Estos resultados son relevantes al considerar que, en su ciclo de vida, la garrapata pone miles de huevos en el pasto, que eclosionan eventualmente a larvas; por lo cual, al inhibirse la ovoposición y cantidad de huevos por ovoposición se realiza un control directo sobre la población de garrapatas futuras (Álvarez et al. 2017). Gindini et al. (2002) y Fernández et al. (2010), que los hongos entomopatógenos como *M. anisopliae* reduce la fecundidad de las hembras y en conjunto con *Beauveria sp.*, es utilizado para el

control de varias especies de garrapatas. No obstante, al tratarse de un método de control biológico y no químico, los resultados encontrados por *Beauveria peruviana* para controlar el potencial reproductivo en un 90 %, resultan aceptables, porque si bien es cierto para suprimir la ovoposición a un 99.9% se requiere una concentración del hongo *Beauveria peruviana* sumamente más elevada.

En cuanto a los índices de inhibición de la eclosión se ve afectada significativamente con la concentración  $1 \times 10^9$  conidios/ml utilizada no permitiendo la emergencia de larvas infestantes de manera normal, obteniendo un control aceptable sobre este parámetro. Este hecho es importante resaltarlo debido a que al tratarse de un control aceptable sobre este parámetro logrando *Beauveria peruviana* el 76.72% lo cual es mayor a lo reportado por Nunes (2019), quien en su investigación logro una reducción del 27,37% en la eclosión de huevos con *B. bassiana* en una concentración de  $10^9$  conidios/mL

Los bioensayos realizados demuestran que el efecto de *Beauveria peruviana* es variable de acuerdo al estadio de *Rhipicephalus microplus*, pero sin embargo representa los mejores prospectos encontrados para ser probada a futuro a niveles de campo que permitan desafiar bajo condiciones multifactoriales, que demuestren su viabilidad para el control de garrapatas en condiciones naturales.

## V. CONCLUSIONES

En condiciones de laboratorio el hongo *Beauveria peruviana*, fue altamente patogénica sobre *Rhipicephalus microplus* teleoginas y adultas alcanzando una mortalidad del 92% en la concentración de  $10^9$  conidios/ml.

La concentración de *Beauveria peruviana* de  $1 \times 10^9$  conidios / mL, es la que más patogenicidad ocasiona en las garrapatas *Rhipicephalus microplus*; en sus diferentes estadios una mortalidad mayor al 90% en los bioensayos estudiados, así mismo, afecta considerablemente los parámetros reproductivos de las garrapatas adultas puestas a tratamiento. La prueba de Dunnett nos indica que todos los tratamientos muestran una diferencia significativa con el testigo, en conclusión, el hongo *Beauveria peruviana* es patógeno para todas las etapas de *Rhipicephalus microplus*.

## **VI. RECOMENDACIONES**

El hongo *Beauveria peruviana* es patógeno para todas las etapas de garrapatas en las pruebas *in vitro*. Requiere la realización de estudios de campo para corroborar su eficacia en condiciones reales y valorar su posible incorporación en el control biológico de garrapatas.



## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, V., Matamoros-Carvajal, T., & Mena-Marín, A. L. (2017). Determinación, in vitro, de la eficacia de los hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, en el control de la garrapata común del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Ciencias Veterinarias*, 35(1), 43-57.
- Angelo, I. C., Fernandes, É. K., Bahiense, T. C., Perinotto, W. M., Moraes, A. P. R., Terra, A. L., & Bittencourt, V. R. E. P. (2010). Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary parasitology*, 172(3-4), 317-322.
- Arguedas, M., Alvares, V., & Bonilla, R. (2008). Eficacia del hongo entomopatógeno *Metharrizium anisopliae* en el control de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Revista de Ciencias Agrícolas*, 32(2), 137–147. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2930972>
- Broglio-Micheletti, S. M., de Souza, L. A., Valente, E. C., de Araújo, M. J., da Silva Dias, N., & Gómez-Torres, M. L. (2012). Evaluación de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887)(Acari: Ixodidae). *Idesia (Arica)*, 30(1), 93-99.
- Bustamante, D. E., Oliva, M., Leiva, S., Mendoza, J. E., Bobadilla, L., Angulo, G., & Calderon, M. (2019). Phylogeny and species delimitations in the entomopathogenic genus *Beauveria* (*Hypocreales*, *Ascomycota*), including the description of *B. peruviana* sp. Nov. *Myckeys*. Recuperado de <https://mycokeys.pensoft.net/article/35764/>
- Campos, J. C., y Velásquez, H. A. (2016). Actividad biológica de dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) sobre *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) en condiciones de laboratorio. Tesis de grado, Bongara.
- Cañedo V. & Ames T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. International Potato Center.

- Delgadillo, O. M., Gómez, M. A., & Jiménez, C. A. (2003). Evaluación del hongo entomopatógeno *Beauveria Bassiana* para la regulación de las poblaciones de garrapatas (*Boophilus microplus*) del ganado bovino en la Hacienda La Esperanza Municipio Mina El Limón del Departamento de León en el periodo de abril del 2006 a agosto del 2007. Recuperado de <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/979/1/205100.pdf>
- Echeverry, D. N. P., & Osorio, L. A. R. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 17(1), 81-95.
- Fernández Ruvalcaba, M., Berlanga Padilla, A.M., Cruz Vázquez, C. & Hernández Velázquez, V.M. 2010. Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la inhibición de oviposición, eclosión y potencial reproductivo en una cepa triple resistente de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini) (Acari: Ixodidae)*. *Entomotropica* 25:109–115.
- Fernández, J. A. (2006). Evaluación de la eficiencia del control de garrapatas (*Boophilus microplus*) con tres frecuencias de aplicación de BAZAM® (*Beauveria bassiana*). Recuperado de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/803/1/T2239.pdf>
- Gindin, G., Samish, M., Zangi, G., Mishoutchenko, A., & Glazer, I. (2002). The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. *Experimental & applied acarology*, 28(1), 283-288.
- Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L., & Olivares, R. (2008). Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Academia*, 7(13), 50-74.
- 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(1), 42–46.
- Nunes, P. R. (2019). Evaluación in vitro de hongos entomopatógenos en el control de la garrapata del ganado bovino. *Saber*, 31, 283-293.
- Oliva Cruz, S. M. (2019). Filogenia molecular y delimitación de especies en el hongo entomopatógeno *Beauveria (Hypocreales, Ascomycota)*.

- Oporta López, J. J. (2017). *Control microbiano de la garrapata Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) del ganado bovino, con hongos entomopatógenos en condiciones de laboratorio* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria).
- Pucheta Díaz, M., Flores Macías, A., Rodríguez Navarro, S., & De la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856-860.
- Requejo Sánchez, E. (2019). *Patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre picudo de la caña (Coleoptera: Curculionidae), bajo condiciones de laboratorio, Chachapoyas-Amazonas* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza-UNTRM).
- Salazar, R. S. (2015). Variación de la población de garrapatas *Rhipicephalus microplus* sobre bovinos pastoreando en sistemas silvopastoriles y monocultivos tradicionales. Recuperado de <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/58063/32183129.2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- SENASA. (2014). Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. Lima -Perú: Laboratorio de Entomopatógenos SCB - SENASA.
- Tofiño, A. P., Ortega, M., Pedraza, B., Perdomo, S. C., & Moya, D. C. (2018). Efectividad de *Beauveria bassiana* (Baubassil®) sobre la garrapata común del ganado bovino *Rhipicephalus microplus* en el Departamento de la Guajira, Colombia. *Revista argentina de microbiología*, 50(4), 426–430. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754117301773>
- Walker, J.B. (1977). Técnicas de investigación para las especies de garrapata que afectan a los animales domésticos. Documento presentado en el Seminario internacional sobre ecología y control de los parásitos externos de importancia económica que afectan el ganado en América Latina. Centro Internacional de Agricultura Tropical (Ciat) p. 27-40.
- Zárate, H. (2016). Adaptación de *Metarhizium sp* como entomopatógeno de garrapatas. México.

## VIII. ANEXOS

### Anexo 01: Fichas de evaluación

**Ficha 1:** Ficha de registro de muertes diarias de *Rhipicephalus microplus* inoculadas con hongo *Beauveria peruviansis*.

FECHA	1x10 <sup>7</sup>					1x10 <sup>8</sup>					1x10 <sup>9</sup>					TESTIGO				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
15/11/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16/11/20	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17/11/20	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18/11/20	1	0	0	0	0	0	2	0	1	1	3	3	0	1	0	1	0	1	0	0
19/11/20	1	1	0	2	2	3	0	0	0	3	2	2	2	2	5	0	0	0	0	0
20/11/20	2	3	3	2	0	1	3	3	2	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	4	4	4	4	2	5	5	3	5	4	5	5	5	5	5	1	0	1	0	0
<b>TOTAL POR TRATAMIENTO</b>																				
<b>O</b>	18					22					25					2				

**Ficha 02:** Ficha de registro de muertes diarias de *Rhipicephalus microplus* teleoginas inoculadas con hongo *Beauveria peruviansis*.

FECHA	1x10 <sup>7</sup>					1x10 <sup>8</sup>					1x10 <sup>9</sup>					TESTIGO				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
15/11/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16/11/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17/11/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
18/11/20	1	0	0	1	1	0	2	0	1	0	2	2	0	0	2	0	0	0	0	0
19/11/20	1	4	0	3	0	2	2	4	4	3	3	1	4	5	2	0	0	0	0	0
20/11/20	1	0	2	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	3	4	2	5	2	2	4	5	5	3	5	4	5	5	4	2	1	0	0	0
<b>TOTAL POR TRATAMIENTO</b>																				
	16					19					23					3				

**Ficha 03:** Ficha de registros de pesos de huevo de *Rhipicephalus microplus*.

<b>NUMERO DE GARRAPATA</b>	<b>1x10<sup>7</sup></b>	<b>1x10<sup>8</sup></b>	<b>1x10<sup>9</sup></b>	<b>TESTIGO</b>	
<b>PLACA 5</b>	<b>1</b>	0.021	0.003	0	0.040
	<b>2</b>	0.013	0.002	0	0.039
	<b>3</b>	0.011	0.0005	0	0.010
	<b>4</b>	0.018	0.0005	0	0.036
	<b>5</b>	0.022	0	0	0.010
<b>PLACA 4</b>	<b>1</b>	0.014	0.001	0.012	0.037
	<b>2</b>	0.005	0	0.001	0.018
	<b>3</b>	0	0	0	0.019
	<b>4</b>	0	0	0	0.026
	<b>5</b>	0	0	0	0.020
<b>PLACA 3</b>	<b>1</b>	0.021	0.014	0.0005	0.021
	<b>2</b>	0.009	0.003	0	0.023
	<b>3</b>	0.024	0.001	0	0.019
	<b>4</b>	0.015	0	0	0.028
	<b>5</b>	0.009	0	0	0
<b>PLACA 2</b>	<b>1</b>	0.024	0.022	0.020	0.033
	<b>2</b>	0.055	0.011	0.002	0.020
	<b>3</b>	0.013	0.020	0	0.018
	<b>4</b>	0.005	0.001	0	0.021
	<b>5</b>	0.012	0	0	0.038
<b>PLACA 1</b>	<b>1</b>	0.054	0	0.0005	0.039
	<b>2</b>	0.004	0	0	0.026
	<b>3</b>	0.008	0.014	0	0.028
	<b>4</b>	0.008	0.010	0	0.040
	<b>5</b>	0	0.006	0	0

**Ficha 04:** Ficha de registros de pesos de huevo de *Rhipicephalus microplus* teleoginas.

<b>NUMERO DE GARRAPATA</b>	<b>1x10<sup>7</sup></b>	<b>1x10<sup>8</sup></b>	<b>1x10<sup>9</sup></b>	<b>TESTIGO</b>	
<b>PLACA 5</b>	<b>1</b>	0.003	0.002	0	0.066
	<b>2</b>	0.073	0.005	0.046	0.135
	<b>3</b>	0.052	0	0	0.109
	<b>4</b>	0.008	0	0	0.040
	<b>5</b>	0.005	0	0	0.069
<b>PLACA 4</b>	<b>1</b>	0.003	0.001	0.003	0.110
	<b>2</b>	0.002	0.002	0	0.048
	<b>3</b>	0.003	0	0.008	0.088
	<b>4</b>	0.001	0	0.007	0.033
	<b>5</b>	0.063	0	0	0.033
<b>PLACA 3</b>	<b>1</b>	0.043	0.001	0.052	0.042
	<b>2</b>	0.027	0.0005	0.015	0.064
	<b>3</b>	0.073	0.0002	0	0.123
	<b>4</b>	0.056	0.0005	0	0.046
	<b>5</b>	0.021	0	0	0.100
<b>PLACA 2</b>	<b>1</b>	0.030	0.017	0.005	0.026
	<b>2</b>	0.100	0	0.003	0.104
	<b>3</b>	0	0.0005	0.024	0.043
	<b>4</b>	0	0.001	0.002	0.190
	<b>5</b>	0	0.005	0	0
<b>PLACA 1</b>	<b>1</b>	0.031	0.036	0	0.049
	<b>2</b>	0.031	0.043	0	0.074
	<b>3</b>	0.014	0.017	0	0.041
	<b>4</b>	0	0.005	0	0
	<b>5</b>	0.019	0.018	0	0

## Anexo N° 02: Panel fotográfico

### Figura 10

Preparación de PDA



### Figura 11

Reactivación de hongo *Beauveria peruviana* en la cámara de flujo de aire laminar e incubación.



**Figura 12**

Preparación de sustrato de arroz





**Figura 13**

Inoculación del sustrato de arroz con *Beauveria peruviansis* en la cámara de flujo de aire laminar e incubación.



**Figura 14**

Lavado y desinfección de *Rhipicephalus microplus*



**Figura 15**

Preparación de la suspensión de conidios de hongo *Beauveria peruviana*.



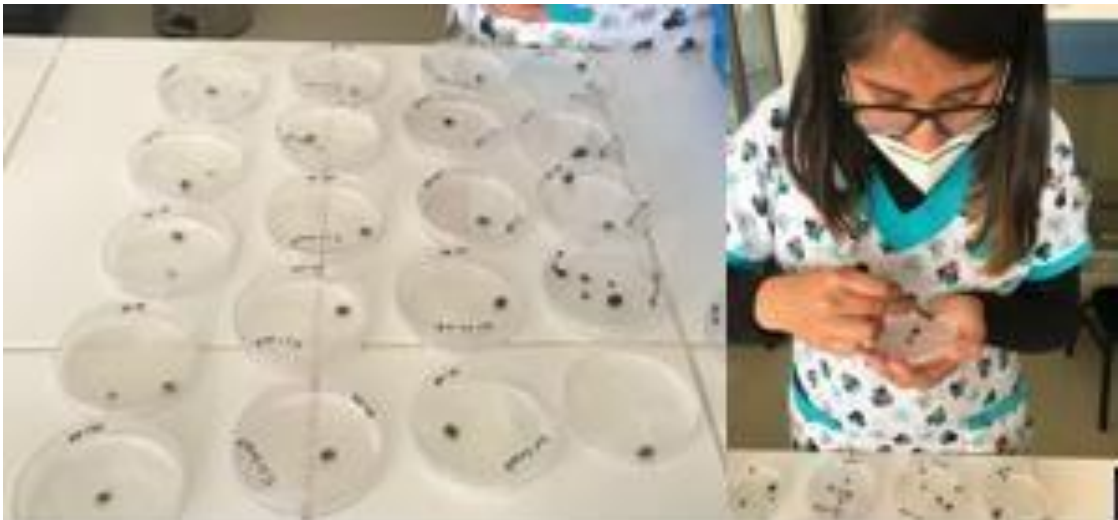
**Figura 16**

Inoculación de *Rhipicephalus microplus*



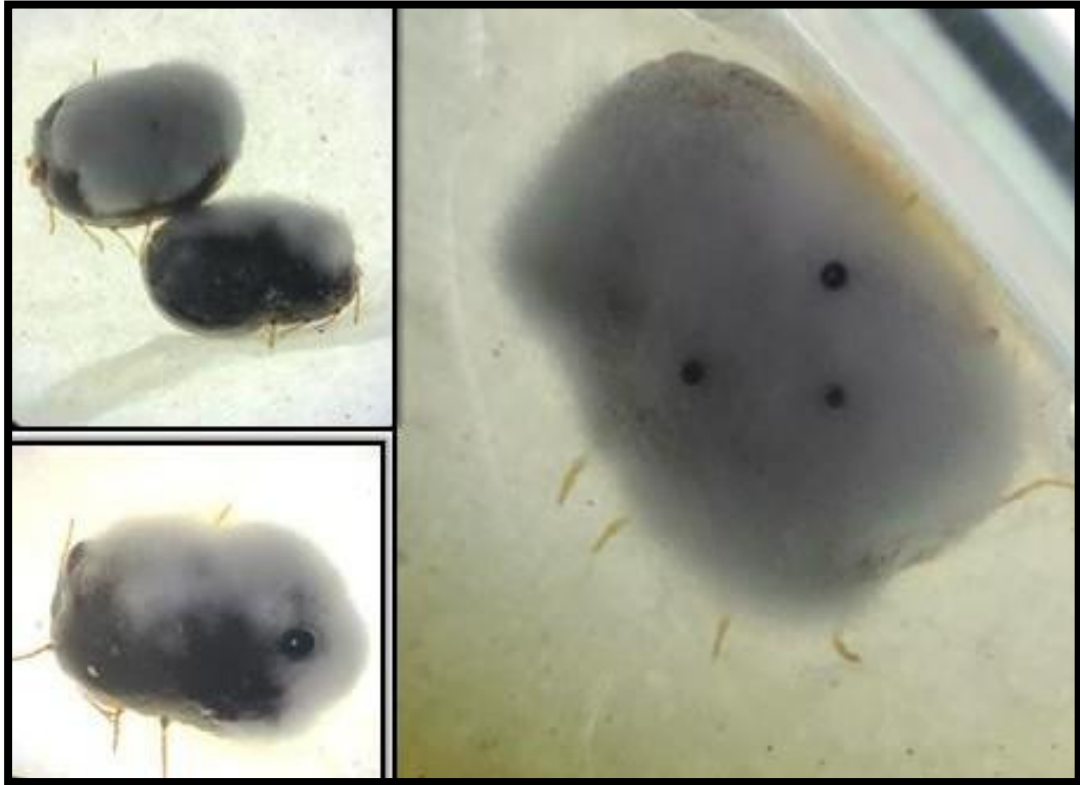
**Figura 17**

Distribución de los tratamientos en estudio.



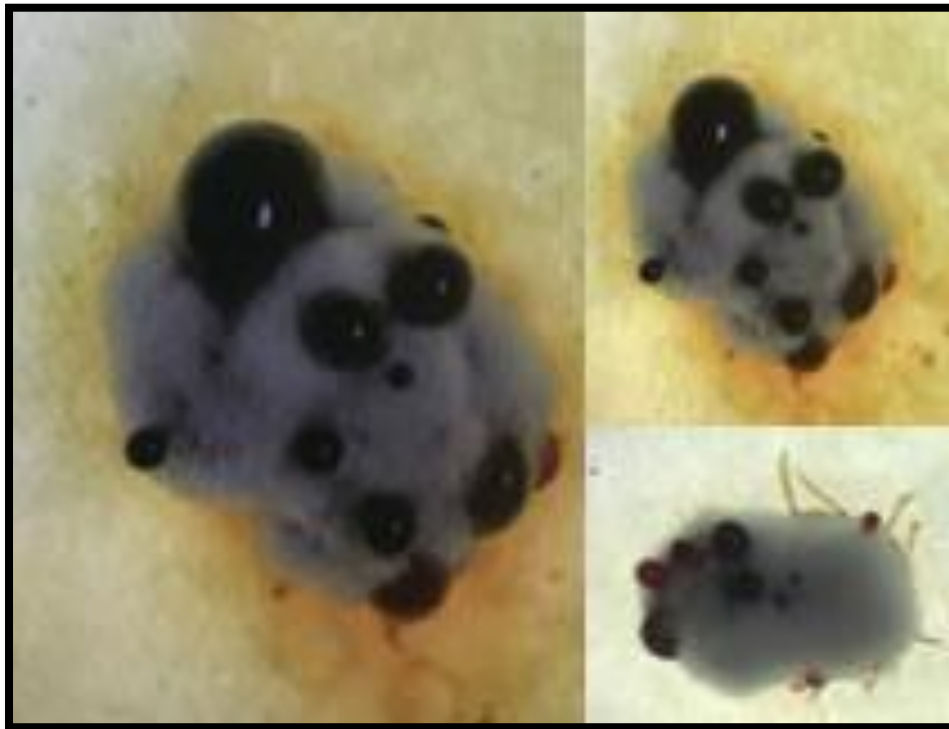
**Figura 18**

Colonización de *Beauveria peruviansis* en *Rhipicephalus microplus*



**Figura 19**

Laceraciones ocasionadas por *Beauveria peruviansis* en *Rhipicephalus microplus*



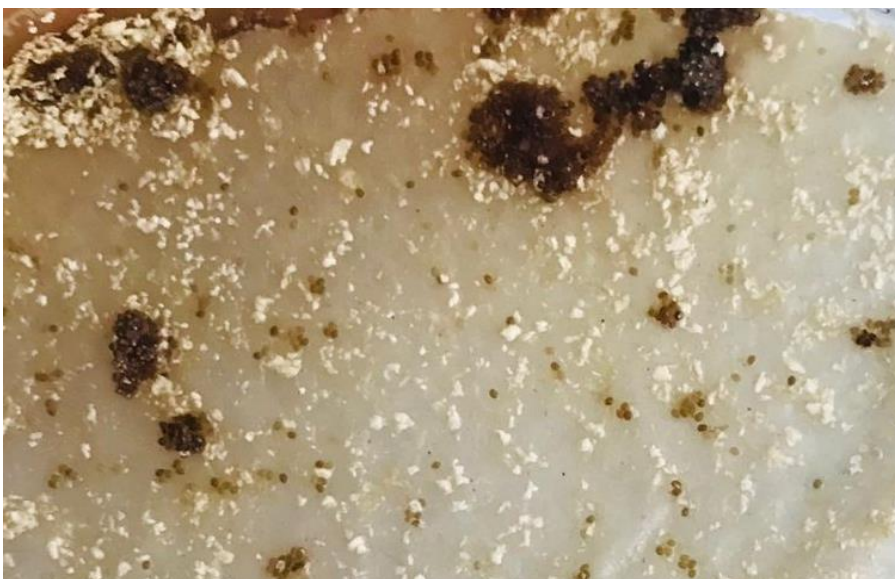
**Figura 20**

Pesado de huevos de *Rhipicephalus microplus*



**Figura 21**

Inoculación de huevos de *Rhipicephalus microplus*



**Figura 22**

Observación y conteo en estereoscopio de huevos no eclosionados y ninfas de *Rhipicephalus microplus*



**Figura 23**

Colonización de *Beauveria peruviana* en huevos *Rhipicephalus microplus*

