

**Subsecretaría de Educación Superior
Dirección General de Educación Superior Tecnológica
Instituto Tecnológico de la Zona Maya**

“Reproducir y evaluar la efectividad del hongo Entomopatógeno (*Metarhizium anisopliae*), como control biológico de la garrapata (*Boophilus microplus*)”

**Informe Técnico de Residencia Profesional que
presentan los alumnos:**

C. Miguel Gabriel Narváez Can

No. de Control 10870143

C. Lucía Aracely Soberanis Vázquez

No. de Control 10870191

Carrera: Ingeniería en Agronomía

Asesora Interna: Lic. Laura Isabel Sansores Lara

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA MAYA

El Comité de revisión para Residencia Profesional del estudiante de la carrera de INGENIERÍA EN AGRONOMÍA, **Miguel Gabriel Narváez Can**; aprobado por la Academia del Instituto Tecnológico de la Zona Maya integrado por; el asesor interno Lic. Laura Isabel Sansores Lara, el asesor externo el C. Fidel Palacios Herrera, habiéndose reunido a fin de evaluar el trabajo titulado “Reproducir y evaluar la efectividad del hongo Entomopatógeno (*Metarhizium anisopliae*), como control biológico de la garrapata (*Boophilus microplus*)” que presenta como requisito parcial para acreditar la asignatura de Residencia Profesional de acuerdo al Lineamiento vigente para este plan de estudios, dan fé de la acreditación satisfactoria del mismo y firman de conformidad.

ATENTAMENTE

Asesor Interno



Lic. Laura Isabel Sansores Lara

Asesor Externo



C. Fidel Palacios Herrera



Juan Sarabia, Quintana Roo, Diciembre, 2014.

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA MAYA

El Comité de revisión para Residencia Profesional de la estudiante de la carrera de INGENIERÍA EN AGRONOMÍA, **Lucía Arcely Soberanis Vázquez**; aprobada por la Academia del Instituto Tecnológico de la Zona Maya integrado por; el asesor interno Lic. Laura Isabel Sansores Lara, el asesor externo el C. Fidel Palacios Herrera, habiéndose reunido a fin de evaluar el trabajo titulado "Reproducir y evaluar la efectividad del hongo Entomopatógeno (*Metarhizium anisopliae*), como control biológico de la garrapata (*Boophilus microplus*)" que presenta como requisito parcial para acreditar la asignatura de Residencia Profesional de acuerdo al Lineamiento vigente para este plan de estudios, dan fé de la acreditación satisfactoria del mismo y firman de conformidad.

A T E N T A M E N T E

Asesor Interno



Lic. Laura Isabel Sansores Lara

Asesor Externo



C. Fidel Palacios Herrera



Juan Sarabia, Quintana Roo, Diciembre, 2014.

ÍNDICE	
Contenido	Páginas
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
JUSTIFICACIÓN	5
OBJETIVOS	6
Objetivos generales	6
Objetivos específicos	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Lugar de experimentación	7
Materiales utilizados	8
Proceso de desinfección del laboratorio	8
Lavado y desinfección del agar de cultivo utilizado	9
Esterilización del arroz como medio de cultivo	11
Proceso de inoculación e incubación del hongo <i>M. anisopliae</i>	12
Cosecha del hongo <i>M. anisopliae</i>	18
Conteo de conidios	19
Preparación de dosis por hectárea	20
Aplicación de los tratamientos en las unidades productoras de ganado bovino	21
Colecta de garrapatas	23
RESULTADOS	24
CONCLUSIÓN	27
Literaturas consultadas	28

**Reproducir y evaluar la efectividad del hongo Entomopatógeno
(*Metarhizium anisopliae*), en campo como control biológico de
la garrapata (*Boophilus microplus*).**

INTRODUCCIÓN.

La ganadería es una de las actividades agropecuarias que más se practica en la Zona Sur del Estado de Quintana Roo, principalmente en el municipio de Othón P. Blanco, en la cual es combinada con la agricultura tradicional, pero los productores ganaderos se ven afectados al enfrentar un problema de plagas y enfermedades, siendo la garrapata (*Boophilus microplus*), la que más daño causa además de ser parásito potencial como vector transmisor de múltiples enfermedades de forma indirecta, como por ejemplo: la *anaplasmosis* y la *babesiosis*, su hábito alimenticio hematófago, causa un fuerte impacto económico para el productor en su producción y productividad, debido que se ha observado que causa la garrapata por piquetes en la piel del animal provocando abscesos, pérdida de sangre, y para cuando se trata de bovinos para la producción de leche afectan directamente en la mayoría de los casos uno o más cuartos de las glándulas mamarias disminuyendo la producción del lácteo, de igual forma afecta al ganado de engorda en pérdida de peso por ganancia diario del animal, factores que repercuten en los sistemas de producción pecuarios que se implementan en la zona, (Mendiola *et al.*, 2001; Renard *et al.*, 2002; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2003; Rodríguez, 2005; Alonso *et al.*, 2007; Riviera, 2008).

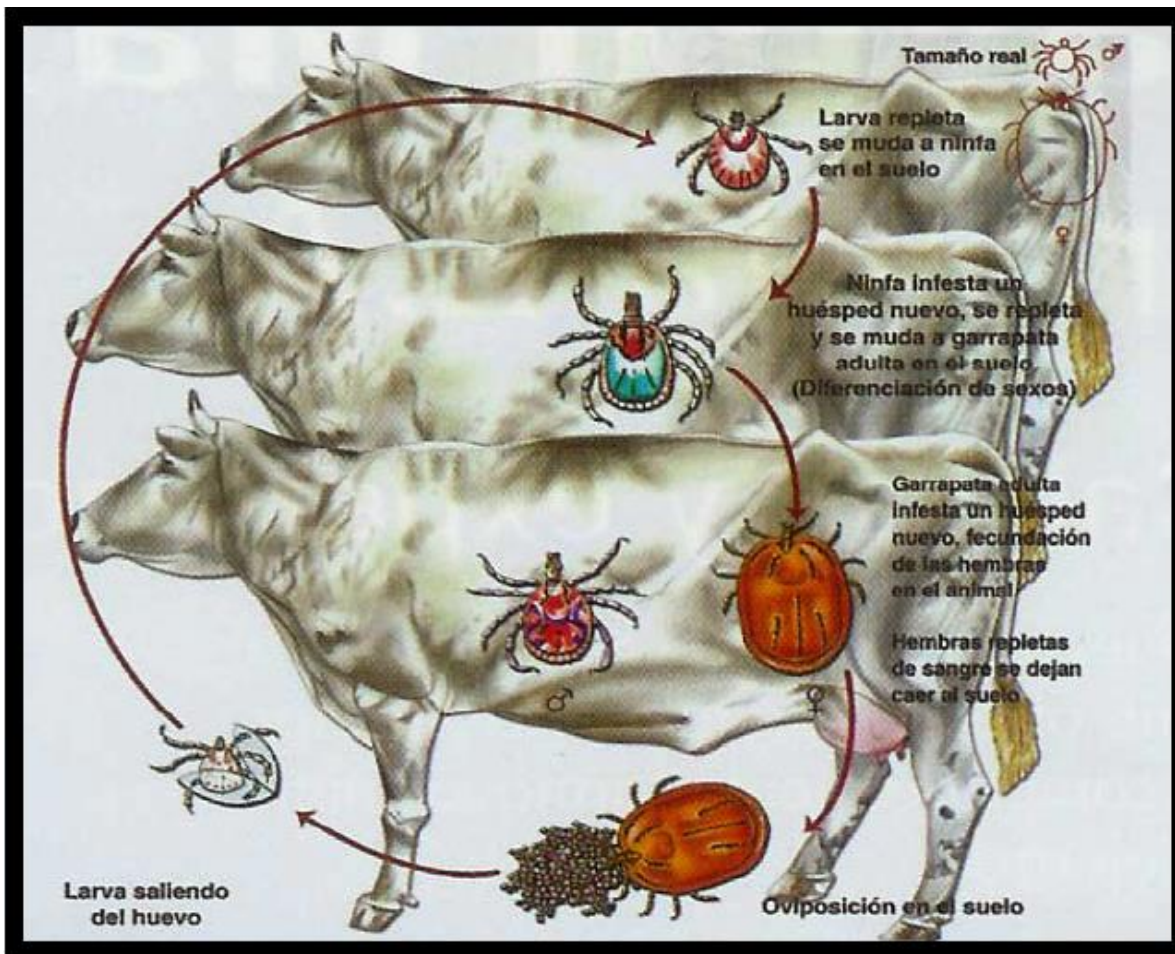
La propuesta puede ser una de las alternativa que puedan mitigar la problemática presente en el sector ganadero de la zona, el uso del Hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* como control biológico contra la garrapata (*Boophilus anisopliae*) (Frazzon *et al.* 2000), que consiste en la prevención y de manera orgánica controlar este parásito, utilizando en lo mínimo, agentes químicos como los garrapaticidas actuales, que en el uso de forma irracional permiten una resistencia en estos parásitos además de su dinámica poblacional que se puede tener casi todo el año.

ANTECEDENTE

La capacidad y resistencia de la garrapata (*Boophilus microplus*), persiste debido a la forma tradicional que los productores manejan sus animales, es decir no tienen un sistema definido de pastoreo y de manejo corrales, y una de las principales consecuencias es el control químico de las garrapatas por el uso excesivo de ha sido el desarrollo paulatino y progresivo de la resistencia uso constante oxidicidas (Fernández et al, 2005) químicos que al contacto con este le permiten al parásito sobrevivir y por otro, heredar estas características a sus respectivas descendencias (Fragoso et al., 1996; Rodríguez, 2005). Además de provocando efectos adversos entorno ecológico con tantas aplicaciones para el control de plagas y enfermedades, asimismo de los altos costos de estos productos, son algunos factores que propician un desarrollo muy activo y poblacional del parasito que encuentran también un ambiente óptimo con las condiciones climáticas de la región.

Ciclo biológico de la garrapata (*Boophilus microplus*)

El ciclo biológico de la garrapata (*Boophilus microplus*) ocurre entre el hospedero, la vegetación y el suelo de un sitio específico, comprende cuatro estados biológicos: el de huevo (incuba de 17 a 21 días), ninfa (5 a 6 días) y adulto (1 a 3 días) (Kaufman y Lomas, 1996); de una fase a otra se lleva a cabo el proceso de ecdisis o desprendimiento del exoesqueleto; la fase parásita se inicia en el suelo (larva), luego trepa a las plantas más cercanas y más tarde al hospedero animal; tanto en los animales como en el suelo, la garrapata está sujeta a cambios ambientales. El adulto se deja caer del hospedero una vez que realiza la cópula.



El género (*Boophilus, microplus*) oviposita de 2,000 a 5,000 huevos, aunque otros géneros pueden ovipositar hasta 20,000 (Krober y Guerin, 2000). La incubación de los huevos ocurre de 17 a 21 días si son favorables las condiciones ambientales, con una temperatura de 20.6° C y un 80% de humedad relativa (Cupp, 1991; Kaufman y Lomas, 1996). Si las condiciones le favorecen, la garrapata puede completar su ciclo de vida en 37 días, pero en la adversidad puede hacerlo hasta los 286 días, según el medio en que se encuentre (Garris, 1991).

Es por eso la importancia de tener un manejo integral preventivo y biológico para minimizar la problemática de la garrapata (*Boophilus microplus*). Con el manejo de organismos biológicos como los hongos entomopatógenos para el control de estos parásitos.

JUSTIFICACIÓN.

Esta investigación de residencia que se llevó a cabo en el laboratorio de Control Biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya y en dos unidades ganaderas, es de importancia económica y ecológica, ya que a la fecha no existe información que refleje la problemática zoonosológica que provoca la garrapata (*Boophilus microplus*), en el ganado bovino en el estado de Quintana Roo. Con este trabajo de residencia se pretende que el productor ganadero cuente con otra alternativa para controlar a la garrapata y al mismo tiempo reduzca el uso de químicos que dañan el ecosistema.

OBJETIVOS

Objetivo general

Generar una alternativa biológica para el control de la garrapata (*Boophilus microplus*) en el hato ganadero del rancho “El Salto del Tigre” unidad de producción ganadera en la comunidad de Cacao municipio de Othón P. Blanco.

Objetivo específico

- Evaluar la eficacia del hongo *M. anisopliae*, como control biológico de la garrapata *B. microplus*, que afecta al ganado bovino.
- Lograr que los ganaderos prueben un producto orgánico que no daña al medio ambiente, no daña a sus cultivos y al humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de experimentación

El presente trabajo de investigación inició en el Laboratorio de Control Biológico (Figura 1) del Instituto Tecnológico de la Zona Maya, ubicado en el Ejido Juan Sarabia, municipio de Othón P. Blanco, Km 21.5 carretera Chetumal-Escárcega y su localización geográfica es $21^{\circ}42'45''$ N y $88^{\circ}30'74''$ W, y en el Rancho “El Salto del Tigre” (Figura 2) de la comunidad de Cacao, localizado geográficamente en las coordenadas $18^{\circ}11'53,81''$ N y $88^{\circ}41'17,64''$ W de este Estado de Quintana Roo, durante el periodo de Julio a Diciembre 2014.

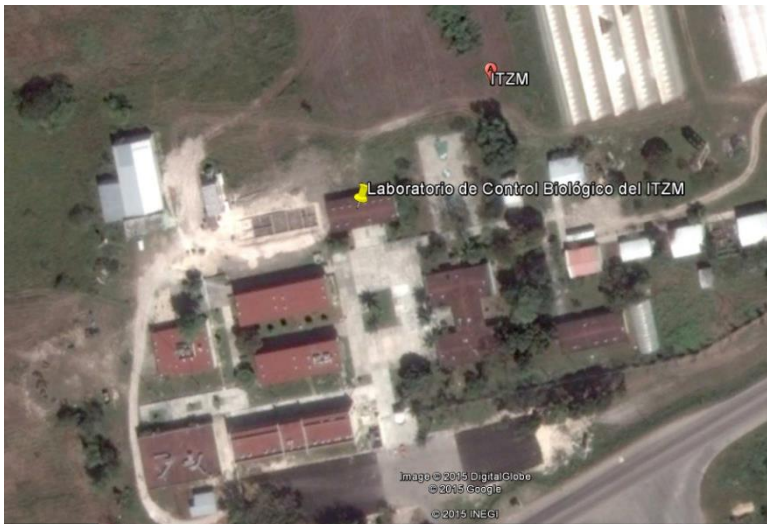


Figura 1. Laboratorio de Control Biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya.



Figura 2. Comunidad de Cacao, Quintana Roo.

Materiales utilizados

La reproducción del hongo *Metarhizium anisopliae*, se llevó a cabo en el Laboratorio de Control Biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya.

La metodología del cultivo del hongo *M. anisopliae* se desarrolló de la siguiente manera:

Proceso de desinfección del Laboratorio.



Se realizó la desinfección de todas las áreas del laboratorio (área de esterilización y el área de inoculación e incubación) desde remover el polvo hasta el trapeado del piso con cloro al 1% de agua/litro. (Figuras 3, 4, 5 y 6)

Se colocaron tapetes sanitarios con cloro y alcohol para desinfectar áreas de trabajo, e instrumentos y las manos antes de tocar algún material.

Lavado y desinfección del agar de cultivo utilizado.

En este proceso utilizamos los siguientes materiales y equipos:

Materiales

Enroxil al 10%

Cloro

Agua purificada

Arroz como agar de cultivo

Bolsa de plástico de ½ kilo

Equipos

Recipiente de 20 lt. de plástico

2 m. de malla mosquitera

Autoclave marca "Felisa"

Vaso precipitado

Preparado de solución para lavado y desinfección de 10 kg de arroz como medio de cultivo.- Se diluye 5 ml. de Enroxil (Figura 7) como antibiótico y 2.5 ml. de cloro (Figura 8) como desinfectante en 10 litros de agua purificada.



Figura 7.- Enroxil al 10%.



Figura 8.- Cloro

Lavado y desinfección del arroz.- En el recipiente de 20 lt. Se le coloca la malla mosquitera sujetándola de manera que no se mueva, se coloca los 10 kilos de arroz sobre la malla mosquitera y se le vierte la solución de lavado preparado anteriormente. Se deja remojar por 15 minutos y posteriormente se escurre. Para finalizar este paso se embolsan con 250 gr. de arroz en cada bolsa. (Figuras 9, 10 y 11).



Figura 9.



Figura 10.



Figura 11.

Esterilización del arroz como medio de cultivo.

Una vez embolsado el arroz se acomodó en el equipo autoclave marca “Felisa” y se esterilizó a una temperatura de 120° C y 1.2 de presión atmosférica por 20 minutos y se dejó enfriar por 24 horas. (Figuras 12, 13, 14 y 15).



Proceso de inoculación e incubación del hongo *Metarhizium anisopliae*.

Materiales	Equipos
Enroxil al 10%	Pistola dosificadora
Index A (dispersante)	Tubos de ensayo
Algodón	Pipetas
Cloro	Matraz Erlenmeyer de 1000 ml.
1 lt agua purificada	Agitador magnético CIMAREC
Agar de Arroz medio de cultivo	Autoclave marca “Felisa”
Dermo Clean (Cloruro de Benzalconio)	2 Mecheros de alcohol
	Papel aluminio
	Pinzas

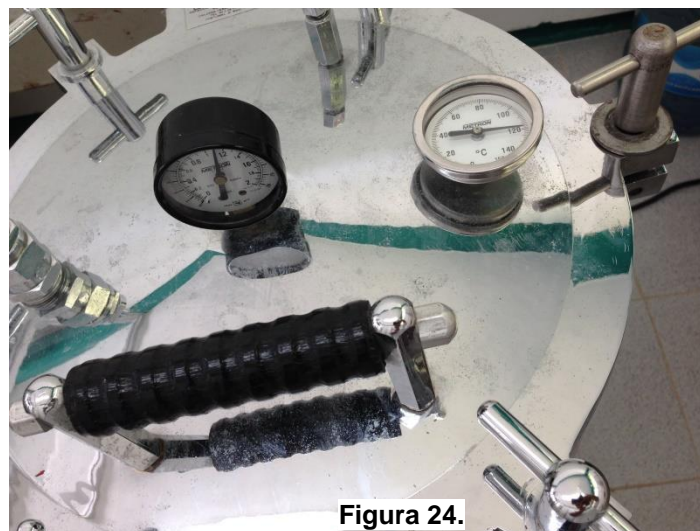
Desinfección de los instrumentos de inoculación.- La pistola dosificadora (Figura 16) se desinfectó con Dermo Clean (Figura 17) .



Preparación de la solución para diluir el hongo *M. anisopliae*.- Para la preparación de la solución se utilizó con la ayuda de las pipetas graduadas, 0.5 ml de Enroxil al 10% como antibiótico y 5 gotas de Index A como dispersante diluido en el matraz Erlenmeyer conteniendo 1 litro de agua purificada, posteriormente se homogenizó en el agitador magnético por unos minutos; una vez homogenizado se vertió parte de la solución a 2 tubos de ensayo tapando éstos con algodón, y el sobrante se mantiene en el Matraz Erlenmeyer tapándolo con algodón y papel aluminio. (Figuras 18, 19, 20, 21 y 22).



Esterilización de la solución e instrumentos para la inoculación del hongo *M. anisopliae*.- En la autoclave marca “Felisa” se esterilizó la solución donde se diluirá el hongo *M. anisopliae* para la inoculación, los tubos de ensayo con solución, las pinzas y las mangueras de la pistola dosificadora, a una temperatura de 120° C y 1.2 de presión atmosférica por 20 minutos. (Figuras 23, 24 y 25).



Inoculación e Incubación.



Desinfección del área. se desinfecto todo el área de inoculación de manera manual con cloro diluido al 1% por litro/agua. (Figura 25)



Esterilización de la campana de flujo laminar. Aquí se aplicó el método de desinfección físico-seco del tipo flameado. (Figura 26)

Inoculación del hongo *Metarhizium*.

Antes de manipular el material y el equipo para la inoculación se desinfectan las manos con alcohol. Seguido de esto se procede a disolver el hongo *Metarhizium anisopliae* con la solución esterilizada contenida en un tubo de ensayo, una vez disuelto el hongo se vierte el matraz Erlenmeyer.

Se procedió a inocular las bolsas de agar de arroz con la pistola dosificadora conectada a la suspensión del inóculo con una concentración de 1×10^8 conidias/ml, esto se realizó dentro de una campana de flujo laminar esterilizada, sellando el orificio de entrada con cinta adhesiva, y se mueven las bolsas para distribuir homogéneamente el inóculo. (Sandoval, 2001). (Figura 27).



Figura 27.- Proceso de inoculación en las bolsas de arroz como medio de cultivo.

Incubación del hongo *M. anisopliae*.

El área de incubación o maduración deberá estar con suficiente luz, con una temperatura ambiente sostenida de 25° C, las bolsas se colocaron en anaqueles y fué removido el arroz (Figura 28) cada 72 horas para homogenizarlos y romper las estructuras de micelio, y con ello obtener la mayor cantidad de esporas libres. El tiempo requerido para tener una máxima cantidad de esporas es de 21 a 24 días para su madurez.



Figura 28.

Cosecha del hongo *Metarhizium anisopliae*.

Cuando las esporas ya alcanzaron su madurez (Figura 29), se extraen del sustrato. El polvo que se obtiene contiene conidias y micelio más las partículas de arroz. La extracción se hizo de forma manual por tamizado o frotación (Figura 30).



Figura 29.- Hongo *Metarhizium anisopliae* en su estado de madurez.



Figura 30.- Proceso del tamizado.

Secado y embolsado de la cosecha.- El objetivo del secado es la eliminación de la humedad del hongo, el contenido de la cosecha se depositó en bandejas de plástico (Figura 31) que se dejaron a temperatura ambiente para eliminar el exceso de humedad, para posteriormente embolsarlo en bolsas de papel.



Figura 31.

Conteo de conidios.- Una vez que el hongo esporuló sobre el arroz, se realizó un conteo de esporas utilizando 1 gr de hongo vertido en 1 litro de agua purificada y 5 gotas de Index A como dispersante diluidos en un matraz Erlenmeyer, con la ayuda de un agitador magnético y una plancha se mezcla a 8 ó 9 rpm durante 20 minutos.

Posterior se toma un gotita de la solución de la parte de en medio del vaso, se depositan en el cubreobjetos junto con la cámara de Neubauer y se procede a contar las esporas. (Figura 32).

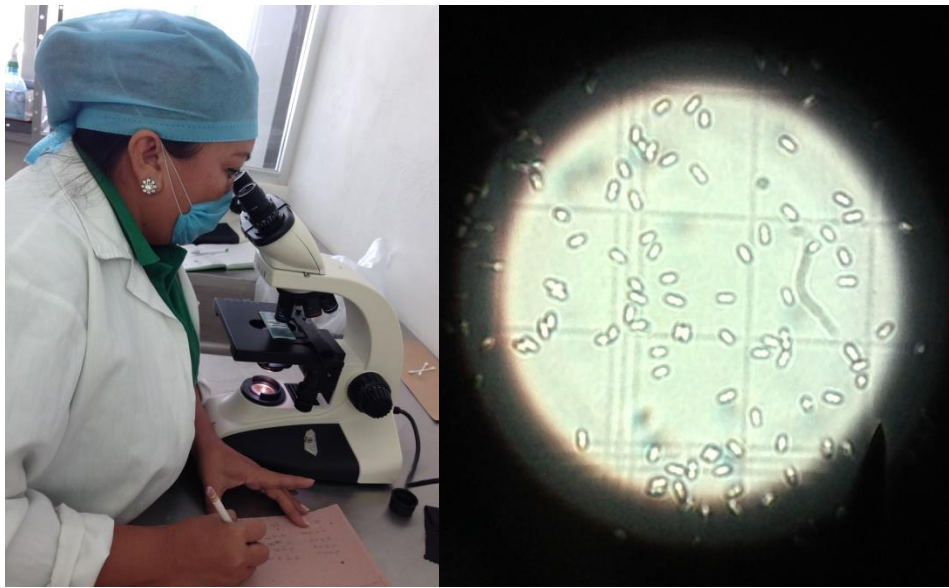


Figura 32.- Conteo de conidios en la Cámara de Neubauer.

Viabilidad. Se determinó el número de conidias por ml. y el número total de conidias utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Conidias / ml} = \# \text{ de conidias contadas} \times 25,000 \times \text{factor de dilución}$$

(Cañedo y Ames, 2004)

En el conteo de conidias se obtuvo:

$$\text{Conidias / ml} = 844 \text{ conidias} \times 25,000 \times 1000 \text{ ml}$$
$$\text{Conidias / ml} = 2.11 \times 10^{10}$$

Con la ayuda de una balanza digital se formuló los tratamientos ajustando la dosis hasta obtener los tratamientos de 1×10^8 y 1×10^{12} que utilizamos, quedando de la siguiente manera:

Tratamientos	Concentración en gr de conidios	Concentración de conidios en 500 ml
T1	0.50	1×10^8
T2	0.75	1×10^{12}

Preparación de dosis por hectárea.

En este procesos realizamos dosis del *M. anisopliae* con diatomita para ayudar a la esporulación del hongo durante el proceso de aplicación del tratamiento al ganado y en los potreros.



Y otra dosis del hongo puro sin ningún aditivo que nos sirvió como comparativo para medir la efectividad del *M. anisopliae* hacia la garrapata (*Boophilus microplus*)

Aplicación de los tratamientos en las unidades productoras de ganado.

Tratamiento (T1) en el Rancho1 con la dosis de 1×10^8 aplicado a 46 ganados (Figura 33).

Hora de aplicación: entre 06:00 a 08:00 am

Técnica aplicada: Aspersión manual, con una bomba de aspersión.



Figura 33.- aplicación del tratamiento con la dosis de 1×10^8

Tratamiento (T2) en el Rancho2 con la dosis de 1×10^{12} aplicado a 28 ganados.
(Figura 34).

Hora de aplicación: entre 17:00 a 19:00 pm

Técnica aplicada: Aspersión manual, con una bomba de aspersión.



Figura 34.- aplicación del tratamiento con la dosis de 1×10^{12}

Colecta de garrapatas.

En cajas Petri, se depositaron garrapatas tomadas directamente del ganado (Figura 35), después de recibir el tratamiento para ser puestas en observación en el Laboratorio de Control Biológico de Hongos Entomopatógenos del Instituto Tecnológico de la Zona Maya.



Figura 35.- recolecta de muestras.

RESULTADOS.

Resultados de reproducción del hongo.

En esta producción para medir el peso promedio de producto obtenido se pesaron al azar 5 bolsas del agar de arroz después de los 21 días de incubación del *M. anisopliae* de los cuales se obtuvo lo siguiente:

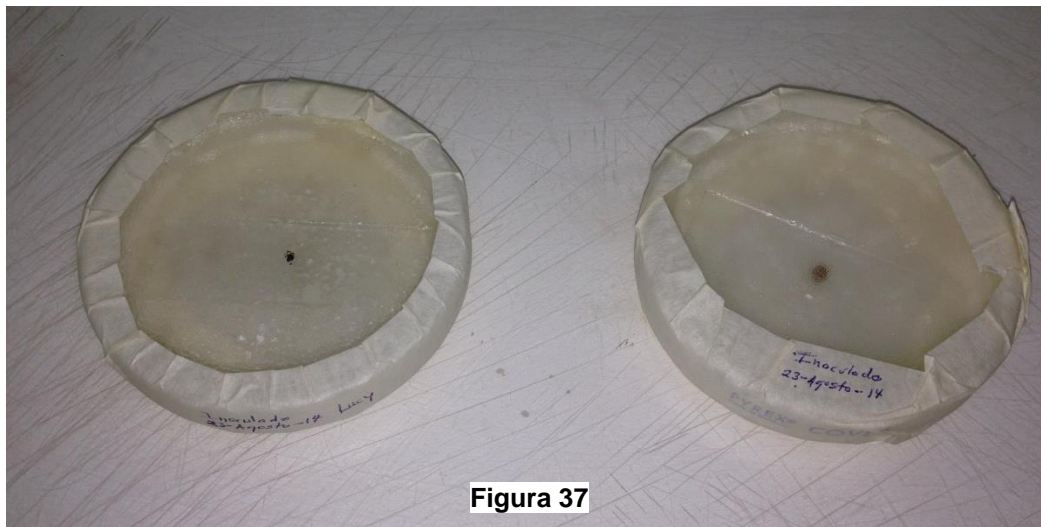
Bolsa	Peso neto c/bolsa (gr.)	Peso Hongo puro (gr.)
1	336	8.50
2	352	10.20
3	360	9.70
4	347	10.00
5	332	10.42
$\sum x =$	1727	48.82
Media (\bar{x})=	345	9.76

Efectividad del hongo *M. anisopliae* en la garrapata (*Boophilus microplus*).

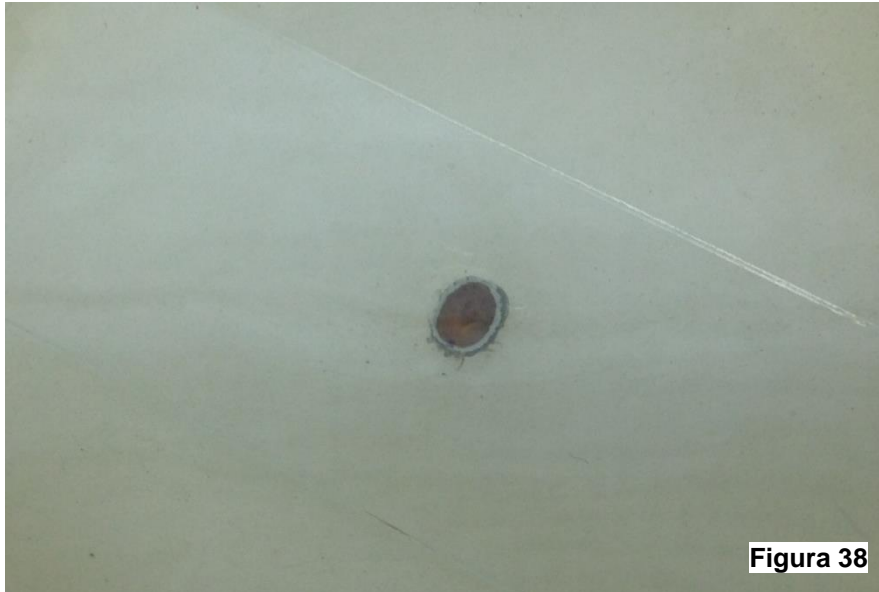
Garrapata *Boophilus microplus* al primer día en laboratorio. (Figura 36).



Garrapata *Boophilus microplus* al tercer día en laboratorio. (Figura 37).



Garrapata *Boophilus microplus* al sexto día en laboratorio. (Figura 38).



Garrapata *Boophilus microplus* a los quince días en laboratorio. (Figura 39).



CONCLUSIÓN

En este trabajo de Residencia podemos concluir que en los dos ranchos donde se aplicó al ganado el hongo *M. anisopliae*, obtuvimos un 80 % viabilidad en el control la garrapata *Boophilus microplus*. Por lo que se puede considerar una alternativa de uso, de importancia económica por su bajo costo de adquisición y producción así como ecológicamente.

Literaturas consultadas.

- Lezama-Gutiérrez, R., J. Molina-Ochoa, O. Robello-Domínguez, A. Trujillo de la Luz, M. González-Ramírez y S. Briseño-Robles (1997). Evaluation of entomopathogenic fungi (Hiphomycetes) against *Anthonomus fulvipes* (Coleoptera: Curculionidae) in organically grown barbados cherry trees. *Vedalia*, 4: 25-29.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten: manual práctico de campo. FAO. 1987(1):5-20.
- Marrufo Espejo, R.C. 1973. Cultivo de hongo entomofágo *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sor. Y ensayos preliminares de su efecto contra el complejo mosca pinta de los pastos y otros insectos. Tesis IAZ. Monterrey, N.L. ITESM. 79p.
- Manuel Fernández-Ruvalcaba, Elyes Zhioua, Zeferino García-Vázquez
Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Boophilus microplus* sensible y resistente a los organofosforados. *Técnica Pecuaria en México*, vol. 43, núm. 3, septiembre-diciembre, 2005, pp. 433-440, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias México.
- Frazzon A.P.G., Vaz Jr.I., Masuda A., Schranka., Vainstein M.H. 2000. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattletick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 94:117-225.
- Miguel Arguedas, Víctor Álvarez, Roberto Bonilla, Eficacia del hongo entomopatógeno *Metharrizium anisopliae* en el control de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Agronomía Costarricense*, vol. 32, núm. 2, julio-diciembre, 2008, pp. 137-147, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.