



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTÉCNIA**

**EFICACIA DE *Metarhizium anisopliae* Ma 198 (Deuteromycotina:  
Hyphomycete) PARA EL CONTROL DE *Rhipicephalus Boophilus microplus*  
EN BOVINOS DEL MUNICIPIO DE LA HUACANA MICHOACÁN**

TESIS QUE PRESENTA:

**Ricardo González Ramírez**

Para obtener el título de:

**Médico Veterinario Zootecnista**

Morelia Michoacán, Marzo, 2016



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTÉCNIA

EFICACIA DE *Metarhizium anisopliae* Ma 198 (Deuteromycotina:  
Hyphomycete) PARA EL CONTROL DE *Rhipicephalus Boophilus microplus*  
EN BOVINOS DEL MUNICIPIO DE LA HUACANA MICHOACÁN

TESIS QUE PRESENTA:

**Ricardo González Ramírez**

Para obtener el título de:

**Médico Veterinario Zootecnista**

Asesores:

**Dra. Ernestina Gutiérrez Vázquez**

Co-Asesora:

**Dra. Margarita Vargas Sandoval**

Morelia Michoacán, Marzo, 2016

## **AGRADECIMIENTO**

El presente trabajo de tesis primeramente me gustaría agradecerle a ti Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A la UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

A mi Asesora de tesis Dra. Ernestina Gutiérrez Vázquez, por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito.

A mi Co- asesora la Dra. Margarita Vargas Sandoval a quien con el más merecido respeto y admiración, de una manera muy especial, le agradezco por brindarme su amistad, tiempo y conocimientos.

También me gustaría agradecer a mis profesores durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado con un granito de arena a mi formación.

A toda mi familia que siempre me brindó su apoyo en todo momento, y creer en mí y por estar apoyándome física y moralmente en mi formación, por esto y más doy gracias.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Para ellos: Muchas gracias y que Dios los bendiga.

## DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mi Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi familia quienes por ellos soy lo que soy.

Para mis padres por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mis hermanos por estar siempre presentes, acompañándome para poderme realizar. A mi hermana Vero quien ha sido y es una mi motivación, inspiración y felicidad.

*“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar”.* Thomas Chalmers

## Índice General

I. INTRODUCCIÓN	13
1.1 Generalidades de garrapatas	15
1.1.1. Clasificación taxonómica	15
1.1.2. Distribución	16
1.1.3. Morfología	16
1.1.4 Epidemiología	18
1.1.5. Hábitos y ecología	19
1.1.6. Ciclo biológico	20
2. Métodos de control	20
2.1 Control químico	21
2.1.1 Resistencia fisiológica hacia los ixodicidas	22
2.2. Control biológico	22
2.3. Hongos entomopatógenos	23
2.3.1 Taxonomía de los hongos entomopatógenos	24
2.3.2. Características de los hongos entomopatógenos	24
2.3.3 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos	25
2.3.4. Toxinas entomopatógenas	27
2.3.5 Ambiente-hongos entomopatógenos	29
2.3.6. <i>Metarhizium anisopliae</i>	30
3. OBJETIVO	32
4. Materiales y Métodos	33
4. 1 Reproducción del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i>	33
4. 2 Cuantificación de conidios	33
4. 3 Descripción de la zona de estudio	34
4. 3. 1 Localización	34
4. 3. 2 Clima	34
4. 3. 3 Estructura y manejo del hato	34
4. 3. 4 Análisis estadístico	35

5. Resultados y Discusión	35
6. Conclusión	41
7. Bibliografía	42

## Índice de Figuras

Figura 1.- Morfología de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> _____	18
Figura 2. Ciclo biológico de la garrapata <i>Rhipicephalus Boophilus microplus</i> .____	20
Figura 3.- Morfología macroscópica y microscópica de <i>Metarhizium anisopliae</i> _	31
Figura 4.- Comparación de la carga de garrapatas del hato Agua Caliente entre grupo tratado con Ma 198 y el testigo. _____	36
Figura 5.- Comparación de la carga de garrapatas del hato El Cobano entre grupo tratado con Ma 198 y el testigo. _____	37
Figura 6.- Comparación de la carga de garrapatas del hato La Mesa entre grupo tratado con Ma 198 y el testigo. _____	38
Figura 7.- Comparación de la carga de garrapatas del hato El Pantano entre grupo tratado con Ma 198 y el testigo. _____	39

## Índice de Cuadros

Cuadro 1.-Promedio de garrapatas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> del hato Agua Caliente en el grupo tratado con Ma 198 y en el grupo Testigo. _____	36
Cuadro 2.-Promedio de garrapatas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> del hato El Cobano en el grupo tratado con Ma 198 y en el grupo Testigo. _____	37
Cuadro 3.-Promedio de garrapatas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> del hato La Mesa en el grupo tratado con Ma 198 y en el grupo Testigo. _____	38
Cuadro 4.-Promedio de garrapatas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> del hato El Pantano en el grupo tratado con Ma 198 y en el grupo Testigo. _____	39

**EFICACIA DE *Metarhizium anisopliae* Ma 198 (Deuteromycotina: Hyphomycete) PARA EL CONTROL DE *Rhipicephalus Boophilus microplus* EN BOVINOS DEL MUNICIPIO DE LA HUACANA MICHOACÁN**

González, R. Ricardo; Gutiérrez, V. Ernestina; Vargas, S. Margarita.

**Tesista. FMVZ. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**

**RESUMEN**

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es el ectoparásito de mayor importancia sanitaria en la ganadería bovina. Los métodos más utilizados para el control de las garrapatas han sido el uso de productos químicos, pero debido a que ciertas familias de garrapatas han sido resistentes a la exposición de algunos ixodicidas, lo cual resultan ineficaces. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de la cepa de *M. anisopliae* Ma198 sobre la infestación de garrapatas *Boophilus microplus* en bovinos bajo condiciones de campo. El tratamiento se aplicó en 4 hatos de ganado infestados de modo natural con garrapatas, en el municipio de La Huacana del estado de Michoacán. Los animales fueron tratados con baños de aspersión con Ma198 a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/ml cada 15 días, por 3 veces realizando un previo conteo de garrapatas antes de cada baño. Los resultados *in vivo* demostraron una disminución en la población de garrapatas. El promedio inicial general de los cuatro hatos fue 37.25 de garrapatas por animal y finalizó con un promedio general de 10.13 garrapatas por animal después de las tres aplicaciones, donde se obtuvo una eficacia del 72.63 %.

**Palabras clave:** Control, Biológico, *Metarhizium anisopliae*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

**Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* Ma 198 (Deuteromycotina: Hyphomycetes) CONTROL OF *Rhipicephalus Boophilus microplus* IN THE MUNICIPALITY OF CATTLE Huacana MICHOACÁN**

González, R. Ricardo; Gutiérrez, V. Ernestina; Vargas, S. Margarita.

**Tesista. FMVZ. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**

Summary

The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick is the major public health importance ectoparasite in cattle. The most used for tick control methods have been the use of chemicals, but because certain families of ticks have been resistant to the exposure of some acaricides, which are ineffective. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of Ma198 *M. anisopliae* strain on *Boophilus microplus* tick infestation in cattle under field conditions. The treatment was applied in 4 herds of cattle naturally infested with ticks, in the municipality of La Huacana the state of Michoacan. The animals were treated by spraying with Ma198 baths at a concentration of  $1 \times 10^8$  conidia / ml every 15 days for 3 times making a previous tick count before each bath. The in vivo results showed a decrease in the tick population. The overall initial average of the four herds was 37.25 ticks per animal and ends with an overall average of 10.13 ticks per animal after three applications, where an efficiency of 72.63% was obtained.

Key words: Control, Biological, *Metarhizium anisopliae*, *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*.

## I. INTRODUCCIÓN

La ganadería contribuye con aproximadamente el 40% de la producción de alimentos, la cual depende cerca de mil millones de personas en todo el mundo, en los últimos 20 años la ganadería ha sido uno de los sectores más dinámicos de la agricultura (FAO, 2009); se estima que los rumiantes aportan el 70% de la proteína consumida por el hombre y el 10% de la fibra natural (Minson, 1990).

En el mundo se reporta una población bovina de 1399 millones de cabezas, en América una población de 488 millones de cabezas en 2004 (FAO, 2009). México cuenta con una población de bovinos de 23 316 942 cabezas, el estado de Michoacán tiene 1 004 565 cabezas de bovinos y en lo que respecta al municipio de La Huacana cuenta con 26 164 cabezas de bovino (INEGI, 2007).

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* se considera el principal ectoparásito que afecta al ganado bovino en las zonas tropicales y subtropicales (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005) ocasiona pérdidas considerables a la ganadería bovina de México, por los graves daños que provoca, ya sea de manera directa o indirecta, (Jonsson y Hope, 2007).

La garrapata se considera responsables de más de 100, 000 casos de enfermedades en humanos, a nivel mundial, son los segundos vectores más importantes de enfermedades después de los mosquitos. En animales salvajes y domésticos son los vectores más importantes de patógenos causantes de enfermedades (De la Fuente *et al.*, 2008).

El impacto económico que causa la garrapata es por el daño a las pieles debido a las picaduras, pérdida de sangre, efectos tóxicos, reducción en la producción tanto de leche como de carne, hay un incremento en los costos del control, aunado a los agentes etiológicos que transmiten: virus, bacterias, rickettsias y protozoos (Ojeda-Chi *et al.*, 2011).

Los métodos que se utilizan para control de las garrapatas se clasifican en químicos y no químicos. Los métodos más utilizados para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es el uso de ixodicidas, entre los que destacan los organofosforados, piretroides, amidinas y lactonas macrocíclicas (Alonso- Díaz *et al.*, 2006). Sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ha provocado que haya resistencia en algunas poblaciones de garrapatas (Rosado-Aguilar *et al.*, 2008).

Dicha resistencia depende de la frecuencia de individuos resistentes en una población de garrapatas y por la intensidad de la presión de selección que se realiza con el empleo de ixodicidas. Cuando las poblaciones de garrapatas son presionadas con ixodicidas se seleccionan poblaciones resistentes (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2007).

Debido a lo anterior se requiere emplear nuevas alternativas de control que eviten la contaminación ambiental, que no dañen la salud pública y no generen resistencia. Se han propuesto otras alternativas como el control genético, el control inmunológico mediante la vacunación y el control biológico (Miller *et al.*, 2008).

El control biológico consiste fundamentalmente en el uso de organismos vivos enemigos de las plagas blanco, con el objetivo principal de reducir poblaciones de parásitos (Samish *et al.*, 2004), en los que podemos encontrar el uso de vacunas (Jonsson *et al.*, 2000), bacterias (Hassanain *et al.*, 1997) y hongos entomopatógenos, de estos, destaca el uso *Metarhizium anisopliae* (Da Silva *et al.*, 2005). Este hongo causa mortalidad en garrapatas adultas, a la vez que disminuyen su fecundidad (Kaaya y Hassan, 2000; Benjamín *et al.*, 2002; Da Costa *et al.*, 2002).

En el estado de Michoacán, el ganado sometido a la aplicación de la cepa Ma 198 de (*M. anisopliae*), muestra una decreciente población de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* donde se registró una eficacia de 96.53% (Valdez, 2013).

## 1.1 Generalidades de garrapatas

Las garrapatas son artrópodos hematófagos pertenecientes a la clase de los arácnidos. Las garrapatas son ectoparásitos obligados, que se alimentan de sangre de los vertebrados, especialmente mamíferos y aves. Son relativamente grandes y de estadios cortos, de alimentación periódica, (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2009).

Las mordeduras de garrapata pueden dañar directamente a los animales, causando irritación, inflamación o hipersensibilidad, y cuando se presenta en grandes números hay anemia y pérdidas en la producción. Las secreciones salivales de algunos ácaros pueden causar toxicosis y parálisis. También pueden transmitir una serie de enfermedades virales, bacterianas, rickettsiales y protozoarios patógenos (Taylor *et al.*, 2007).

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, es una plaga endémica del ganado en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Murrell *et al.*, 2000), causa grandes pérdidas económicas a los productores de ganado por los efectos físicos directos en los animales parasitados e indirectamente a través de la transmisión de agentes infecciosos como *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale* (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005; Oteo *et al.*, 2014).

Un estudio en México ha demostrado el costo de las pérdidas de producción, mortalidad, daños indirectos y por control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y las enfermedades que transmite, el cual fue estimado en 48 millones de dólares americanos por año (Vega, 1991).

### 1.1.1. Clasificación taxonómica

Según la clasificación más reciente, las garrapatas pertenecen a la subclase Acari, del súperorden Parasitiformes dentro del orden Ixodida (Lindquist *et al.*, 2009). El orden Ixodida está formado por tres superfamilias: Argasidae (193 especies garrapatas blandas), Ixodidae (702 especies garrapatas duras) y Nuttalliellidae (monotípico). En México, de las garrapatas duras se registraron 52 taxones

válidos, desde entonces se han adicionado 23, haciendo un total de 75 especies incluidas en 5 géneros (Valdez, 2013).

### **1.1.2. Distribución**

Las garrapatas se encuentran distribuidas en todo el mundo, sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales (Davey *et al.*, 1997). El género *Rhipicephalus* se encuentra en México, Australia, Centro y Oeste de África, Sudán, el Mediterráneo y Sudamérica. Se reporta a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus appendiculatus* y *Amblyomma hebraeum* como especies importantes en América, Asia y África (Gutiérrez, 2013). El hombre favoreció la interacción garrapata-animal esto debido a que mantiene un número elevado de animales en pequeños espacios, por lo tanto, las garrapatas que tenían como huésped herbívoros silvestres, fueron beneficiadas puesto que los rumiantes domésticos sustituyeron con ventaja a los silvestres originales, tanto por su número como por la regularidad de su permanencia siempre en sus mismos campos (Norval *et al.*, 1997; González, 2007).

### **1.1.3. Morfología**

Las garrapatas tienen estructuras singulares a los arácnidos, clase a la que pertenecen (Barandika, 2010), tienen morfología diferenciada entre familias, géneros y especies, pero también entre las fases de su ciclo de vida, es decir, durante la fase larvaria presentan tres pares de patas, como los insectos; en cambio, en las fases de ninfa y adulta poseen cuatro pares de patas que las distinguen de los insectos (Cupp, 1991; Genouvrier, 2013).

El género *Rhipicephalus* forma parte de la familia Ixodidae, compuesta por garrapatas duras, que se caracterizan por tener un escudo dorsal y no pueden sobrevivir por largo tiempo sin un ambiente adecuado. Las garrapatas Ixodidae son de forma oval, aplanadas dorsoventralmente en estado de ayuno y globosas cuando están repletas, con dimensiones que van desde 2 a 8 mm hasta 1 a 2 cm de longitud según el estado fisiológico y con una variación en su color, de amarillento a café oscuro. Las garrapatas duras repletas presentan un límite en el

tamaño, para el caso de los machos, pero no para el caso de las hembras (Gutiérrez, 2013).

Estos ácaros presentan dos partes diferenciales visibles: el tronco globoso y las extremidades articuladas. La parte anterior, no es cabeza propiamente dicha, ya que el cuerpo de la garrapata es una sola masa; tienen un conjunto de pies móviles que forman el gnatosoma y una base que mide 4 mm de largo por 0.9 mm de ancho; por encima de éste, se observan dos depresiones llamadas áreas porosas, de las cuales sobresalen dos ganchos denominados quelíceros que ayudan a romper la piel del hospedero (Beati y Keirans, 2001).

Por debajo de los quelíceros, que aparecen en número par, en forma de hoz y los ocelos a los lados, se observa una prolongación de la base del gnatosoma llamado hipostoma; presenta una fórmula dentaria de 3/3, 4/4 que facilita la acción de perforar la piel del hospedero y, además, participa como órgano de fijación. El hipostoma consta de un par de pedipalpos, cada uno conformado por cuatro artejos y desempeña dos funciones: una, ayuda a proteger las partes suaves de la boca y, la otra, funciona como órgano sensorial, en seguida aparecen las extremidades con seis artejos: coxa, trocánter, fémur, tibia, pretarso y tarso (Figura1) (Voltzit, 1996).

Los adultos y las ninfas poseen estigmas y se sitúan en el último par de coxas, mientras que las larvas carecen de ellas; además presentan dimorfismo sexual, el macho es de menor tamaño que la hembra. Cada extremidad mide en promedio, de 10 a 12 mm en las hembras y de 3 a 4 mm en los machos (Barandika, 2010).

El sistema de protección o cutícula de la garrapata posee tres capas: epicutícula, mesocutícula y endocutícula; en ella se aprecian poros, canales o espiráculos. La primera capa contiene lípidos, sustentos cementantes, cuticulina y polifenol que cumplen la importante función de protección contra la desecación. Este sistema de protección tiene la particularidad de sufrir elongaciones de hasta 20 veces su tamaño original cuando el animal está repleto de sangre (Spickett *et al.*, 1995).

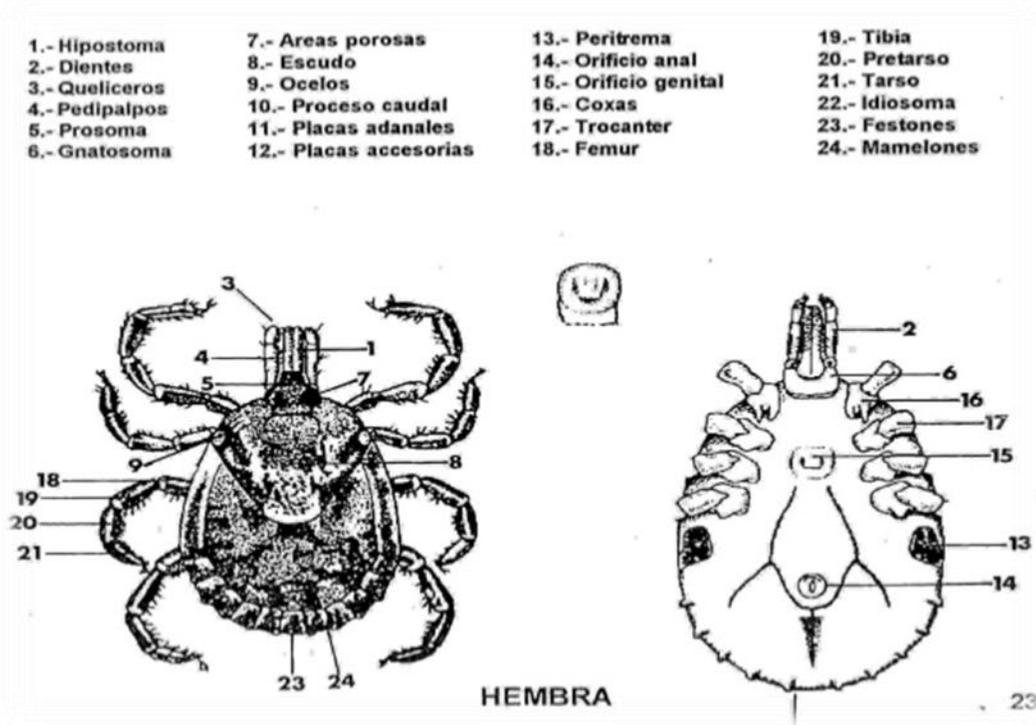


Figura 1.- Morfología de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Tomado de Bazán, 2002).

### 1.1.4 Epidemiología

Los efectos más importantes que producen las garrapatas al ganado bovino son la disminución en el consumo de alimento, pérdida de peso, anemias producidas por pérdida de sangre, irritación por picaduras y depreciación de las pieles afectadas. Al lesionar la piel, pueden transmitir diversos agentes patógenos como virus, bacterias, rickettsias y protozoos. Esto puede conducir a enfermedades agudas, crónicas o incluso, a la muerte de los animales (Ojeda- Chi *et al.*, 2011).

La pérdida de peso de un bovino parasitado por garrapatas del género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* se calcula en 0.26 kg/garrapata/año, lo que representa pérdidas de varios miles de millones de dólares en la economía pecuaria mundial (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005).

Los animales infestados con garrapatas, reducen su consumo de alimento (4.37 kg) en comparación con animales no expuestos a garrapatas (5.66 kg); además reporta alteraciones en los glóbulos blancos y en varios metabolitos entre los que se encuentran la hemoglobina, colesterol, albúmina, globulina, amilasa, fosfatasa alcalina y también es posible que secreten compuestos hepatotóxicos (Jonsson, 2006).

#### **1.1.5. Hábitos y ecología**

Las condiciones óptimas para fomentar el desarrollo de varias generaciones de garrapatas por años son las zonas ecológicas donde llueve regularmente, imperando una alta humedad y clima cálido, estas pueden vivir desde el nivel del mar hasta los 2, 600 msnm y con fluctuaciones de lluvia de 400 a 2,800 mm anuales. En regiones subtropicales, marcadas por temporadas de más o menos lluvias o sequías, la intensidad de la plaga es fluctuante (Davey *et al.*, 1997).

La subsistencia de las garrapatas en sus diversas fases de evolución (huevo, larva, ninfa, adulto), está determinada por factores climatológicos como lluvias, sequías, altitud, heladas, temperaturas medias nocturnas y diurnas, tipo de vegetación, así como por la cantidad de animales a disposición; la temperatura más adecuada es de 26-27°C, la humedad relativa >80% y el tipo de vegetación espesa (Quiroz, 1999; Cortés, 2010).

Una vez que la hembra adulta completa su ciclo, pone sus huevos en sitios húmedos, frescos y libres de la radiación solar, de preferencia en la parte baja de la vegetación predominante, con ello asegura una eclosión alta. Una vez, que emergen las larvas, durante el día se protegen contra la desecación del sol, las larvas suben a las plantas de los pastizales para facilitar el acceso a los hospederos, moviéndose horizontalmente hasta 8 m de su sitio original. Este movimiento es debido a que sus órganos sensoriales perciben bióxido de carbono y feromonas del huésped, hacia los cuales pueden provocar dicho desplazamiento y ataque (Falk-Vairant *et al.*, 1994; Cortés, 2010).

### 1.1.6. Ciclo biológico

El ciclo biológico de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ocurre entre el huésped, la vegetación y el suelo de un sitio específico; comprende cuatro estados biológicos: la hembra adulta se aleja del huésped una vez que realiza la cópula y se repleta de sangre. La hembra oviposita de 2,000 a 5,000 huevos (Guo *et al.*, 1998). 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), larva (7 a 10 días), ninfa (5 a 6 días) y adulto (1 a 3 días)(Figura 2); de una fase a otra se lleva a cabo el proceso de ecdisis o desprendimiento del exoesqueleto; la fase parasitaria, se inicia en el suelo (larva), luego trepa a las plantas más cercanas y más tarde al huésped animal; tanto en los animales como en el suelo, la garrapata está expuesta a cambios de temperatura y humedad ambiental (Kaufman y Lomas, 1996; Genouvrier, 2013).

Si las condiciones le favorecen, la garrapata puede completar su ciclo de vida en 37 días, pero en la adversidad puede hacerlo hasta los 281 días según el medio que se encuentre (Cupp, 1991; Garris, 1991; Genouvrier, 2013).

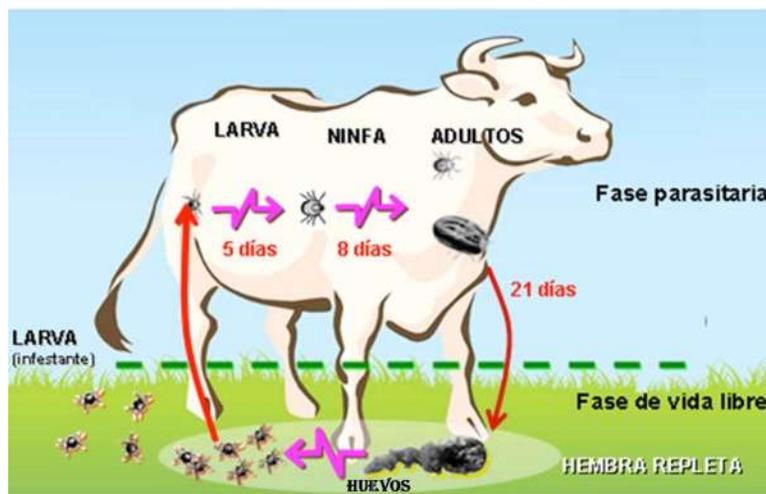


Figura 2. Ciclo biológico de la garrapata *Rhipicephalus Boophilus microplus* (Tomado de Barandika, 2010).

## 2. Métodos de control

Se han desarrollado diversas estrategias para el control de las garrapatas, entre las cuales se pueden citar el uso de productos químicos (Fernández-Ruvalcaba *et al.*, 2005), agentes biológicos, materiales genéticos (Meltzer, 1996), depredadores naturales, agentes biológicos atenuados (vacunas) y la rotación de potreros manejados en forma integral (Morrison, 1996; Fernandes y Bittencourt, 2008). Aunque se afirma que no existe una sola alternativa viable por sí sola, todas ellas tienen algo que aportar (Lawrence *et al.*, 1996; Ojeda-Chi *et al.*, 2011).

El conocimiento de las fases de desarrollo de las garrapatas, tanto aquellas que evolucionan sobre el animal, como las que sobreviven en el ambiente fuera del hospedero, y la relación de éstas con las condiciones ambientales, es primordial para tomar medidas y decisiones para su control (Ojeda-Chi *et al.*, 2011).

### 2.1 Control químico

El control químico de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* se efectúa con productos de la familia de los carbamatos, organoclorados, organofosforados (OF), piretroides sintéticos (PS) (NOM-EM-004-ZOO/1994), amidinas, inhibidores de la regulación del crecimiento (IGR), ivermectinas y las fenilpirazolonas (Alonso-Díaz *et al.*, 2006).

Entre los problemas más importantes a los que se enfrenta el combate químico de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, es el desarrollo de resistencia a los ixodicidas, como ha ocurrido en casi todos los países en donde se han usado por largos periodos (Alonso-Díaz *et al.*, 2006). Generalmente los ixodicidas causan alteraciones en las garrapatas que conducen, a través del proceso de selección, a una adaptación que les permite sobrevivir a las nuevas condiciones artificiales impuestas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005).

Este fenómeno ha sido denominado en términos mundialmente aceptados como “resistencia” y se define como la capacidad adquirida por la fracción poblacional de una especie parásita que le permite sobrevivir a concentraciones de algunos

productos que son capaces de eliminar al resto de la población normal; esta capacidad es transmitida a la siguiente generación (Gutiérrez, 2013).

### **2.1.1 Resistencia fisiológica hacia los ixodicidas**

En 1981 por primera vez fue documentada en México la resistencia en poblaciones de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a partir de fallas de control en la región de Tuxpan, Veracruz (Aguirre *et al.*, 1986).

Las garrapatas modifican sus procesos bioquímicos a fin de dejar a un lado los efectos tóxicos del insecticida y de sus metabolitos. Algunas poseen una deshidroclorinasa que degrada el ixodicida haciéndolo inocuo. En otros casos hay una absorción más rápida y un metabolismo más acelerado del insecticida que en las garrapatas susceptibles. La resistencia a los productos organofosforados la adquieren al detoxificarse utilizando fosfatasas y carboxiesterasas (Domínguez-García *et al.*, 2010).

El problema de resistencia de las garrapatas a los ixodicidas ha motivado el interés por el desarrollo de nuevas estrategias como control biológico, como una alternativa para evitar la infestación y a la vez bloquear la transmisión de patógenos causantes de enfermedades (Alonso-Díaz *et al* 2007).

### **2.2. Control biológico**

El control biológico es típicamente definido como el uso de enemigos naturales, para disminuir la población de uno o más organismos plaga a densidades menores ya sea de forma temporal o permanente (Myers *et al.*, 1994; Simberloff y Stiling, 1996).

Ventajas: El control biológico posee muchas ventajas, poco o ningún efecto nocivo colateral, elimina sustancialmente el uso de insecticidas, no provoca intoxicación y evita plagas secundarias, del mismo modo la relación costo beneficio es favorable (Barrera *et al.*, 2007).

Éxito: El éxito en control biológico es difícil de medir; sin embargo, desde el punto de vista ecológico, alguna clase de éxito se presenta cuando una especie introducida se establece por sí misma (Hokkanen, 1985; Guédez *et al.*, 2008).

Riesgo: Frecuentemente se declara que la introducción de agentes de control biológico es ambientalmente segura y sin riesgos. Sin embargo, existen evidencias que indican que esta aseveración no es del todo cierta. Aunque este tema no es nuevo, los debates sobre los riesgos del control biológico continúan con mayor intensidad (Louda *et al.*, 2003).

Actualmente se reconoce que algún grado de riesgo acompaña a los programas de control biológico como en cualquier otra estrategia de control. Por lo tanto, a fin de reducir el daño inherente a la introducción de enemigos naturales, se deben seguir procedimientos científicos probados (Howarth, 1991).

Los agentes de control biológico de las garrapatas están constituidos por microorganismos patógenos, tales como en hongos entomopatógenos (*Metarhizium sp*; *Beauveria sp*), bacterias (*Cedecea lapagei*, *Escherichia coli* y *Enterobacter agglomerans*), nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditidae* y *Steinernematidae*) y hormigas reguladoras (*Solenopsis germinata*, *S. saevissima*, *Camponotus rengira* y *Ectatomma quadridens*) (Rodríguez- Vivas *et al.* 2009).

### **2.3. Hongos entomopatógenos**

Los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial como agentes de control de insectos, constituyen un grupo con más de 750 especies que al dispersarse en el ambiente provocan infecciones fúngicas a las poblaciones de insectos (Pucheta *et al.*, 2006), entre los géneros más importantes están: *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., *Cordyceps bassiana* (= *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.), *Erynia*, *Eryniopsis*, *Aschersonia*, *Akanthomyces* e *Isaria fumosorosea* (= *P. fumosoroseus* (Wise) (Monzón, 2001).

Se ha informado que al menos 58 especies de hongos entomopatógenos, ya sea en la naturaleza o en experimentos de laboratorio, han infectado por lo menos a 73 especies de Acari (Fernades *et al.*, 2011).

### **2.3.1 Taxonomía de los hongos entomopatógenos**

Los hongos entomopatógenos se clasifican dentro de la división Eumycota, que se caracteriza por no formar plasmodio o pseudoplasmodio y por presentar una fase asimilativa típicamente filamentosa. La subdivisión Deuteromycotina, se caracteriza por no presentar un estado sexual, por lo que se conocen como hongos imperfectos y están integrados en tres clases: Hyphomycetes, Blastomycetes y Coelomycetes. La más importante es Hyphomycetes, porque abarca la mayoría de las especies conocidas como patógenas de insectos (Bazán, 2002).

El género *Metarhizium* está clasificado dentro del grupo Phyalosporaceae, muy próximo al género *Penicillium*; las esporas son alargadas y se forman en cadenas originadas en fiálides; las conidias más jóvenes de la clase del conidióforo, presentan una pigmentación verde y su tamaño permite diferenciar la especie *Metarhizium anisopliae* y *Metarhizium flavoviridae* (Kaaya *et al.*, 1993).

### **2.3.2. Características de los hongos entomopatógenos**

Los hongos entomopatógenos son de gran importancia dentro de los agroecosistemas por su capacidad natural para regular las poblaciones de insectos, la cual depende de la susceptibilidad del hospedero o de la asociación patógeno-hospedero. En este último caso, el insecto hospedero puede ejercer una presión de selección que favorezca a pocos genotipos del patógeno; es decir, hay una selección natural de estos microorganismos en términos de especialización con respecto al hospedero (Samish *et al.*, 2004).

Los hongos entomopatógenos se pueden dispersar y si sobreviven a las nuevas condiciones se pueden establecer en la región en que fueron introducidos, poseen alta especificidad, persistencia en el medio ambiente bajo condiciones adecuadas,

compatibilidad con insecticidas y con otros entomopatógenos, inocuidad ambiental; además son fáciles de manipular, se pueden reproducir masivamente y algunas formulaciones ya se venden comercialmente (Devotto *et al.*, 2003).

Los hongos entomopatógenos han sido aplicados por diferentes métodos (inyección, inhalación, aspersion, exposición ocular, termal y alimenticia) en animales vertebrados tales como: aves, ratas, ratones, conejos y reptiles. No se han observado signos patológicos y toxicológicos hasta la fecha, no obstante lo anterior, los entomopatógenos raramente han sido aislados de humanos u otros animales; sin embargo, pocos casos de micosis en humanos y animales han sido reportados (Valdez, 2013).

Las exposiciones crónicas y la inhalación de altas cantidades de conidias, durante la producción masiva y la aplicación de hongos imperfectos para el control biológico, puede guiar a la sensibilidad que desencadena alergias (Ward *et al.*, 2000).

Existen ciertas limitaciones en su uso, dentro de los factores ambientales algunos les son desfavorables, son sensibles a temperaturas extremas superiores 36°C, a la desecación y a la luz ultravioleta (Polar *et al.*, 2005).

El almacenamiento de las unidades infectivas requiere condiciones mucho más exigentes, en comparación a moléculas inorgánicas. La velocidad de acción controladora que presentan es menor a la de los productos químicos, ya que no matan instantáneamente al insecto plaga (Devotto *et al.*, 2003).

### **2.3.3 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos**

El desarrollo de la enfermedad en el insecto está dividido en tres fases: (1) adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto, (2) penetración en el hemocele y (3) desarrollo del hongo, que generalmente resulta en la muerte del insecto (Carrillo-Rayas y Blanco-Labra, 2009).

Adhesión de la espora a la cutícula del hospedero y germinación de la espora: el primer contacto entre el hongo entomopatógeno (HEP) y el insecto sucede cuando

la espora del HEP es depositada en la superficie de este último. El proceso de adhesión ocurre en tres etapas sucesivas: adsorción de la espora a la superficie mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteica en el insecto, la adhesión o consolidación de la interface entre la espora pregerminada y la epicutícula y finalmente, la germinación y desarrollo hasta la formación del apresorio para comenzar la fase de penetración (Pedrini *et al.*, 2007; Téllez-Jurado *et al.*, 2009).

El proceso de adhesión de la espora a la cutícula del insecto, está mediado por la presencia de moléculas sintetizadas por el hongo denominadas adhesinas. En el entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* se ha descrito un tipo de adhesina denominada MAP1 la cual se localiza en la superficie de los conidios (Pucheta *et al.*, 2006).

Penetración en el hemocele: La forma en la que los hongos entomopatógenos penetran en el insecto depende de las propiedades de la cutícula tales como el grosor, la esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales (Charnley, 1992).

Una vez establecido el proceso de adhesión, continua la penetración la cual es posible gracias a la acción combinada de dos mecanismos uno físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por una estructura fúngica denominada haustorio, la cual deforma primeramente la capa cuticular rompiendo luego las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de actividades hidrolíticas tales como proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido en la zona de penetración, facilitando la entrada del hongo (Monzón, 2001).

Estudios *in vitro* indican que en la digestión del integumento sigue una secuencia de lipasa-proteasa-quitinasa (Delgado y Murcia-Ordoñez, 2011). Se ha observado que la acción enzimática puede ser coadyuvada por la secreción de ácidos orgánicos, como el ácido oxálico (Bidochka y Khachatourians, 1991).

La proteasa Pr1 es considerada un importante factor de virulencia en *Metharizium anisopliae*, la sobreexpresión de esta enzima en el mismo hongo reduce en un 25% el tiempo de muerte del insecto. De la misma forma la sobreexpresión del gen que codifica para la quitinasa de *Beauveria bassiana* acelera el proceso de muerte en los insectos en un 23% (Fan *et al.*, 2007).

Por lo anterior, se demuestra la importancia de la secreción de estas enzimas hidrolíticas en la virulencia de los hongos entomopatógenos, lo cual pudiera ser una herramienta para la selección de mejores cepas para la formulación de insecticidas biológicos. Otro mecanismo que utilizan los hongos para penetrar al hemocele es a través de la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas del insecto. Puesto que la humedad no es un problema en el tracto alimenticio, la espora puede germinar rápidamente en este ambiente; aunque los fluidos digestivos pudieran destruirla o degradar la hifa germinativa. En algunos casos, la digestión de estructuras fúngicas puede causar la muerte por toxicidad más que por la micosis (Charnley, 1992).

Replicación en el hemocele: Después de llegar al hemocele, la mayoría de los hongos realizan transición dimórfica de micelio a levadura y una vez que han evadido el sistema inmune del insecto, se produce una septicemia. La micosis induce a signos fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación, comportamientos alterados y parálisis (Smith *et al.*, 2000; Pucheta *et al.*, 2006).

La muerte sobreviene por una combinación de efectos que comprenden el daño físico de tejidos, toxicosis, deshidratación de las células por pérdida de fluido y consumo de nutrientes (Bustillo, 2001).

#### **2.3.4. Toxinas entomopatógenas**

Ya en el interior del insecto, los hongos deben enfrentarse con los mecanismos de respuesta del sistema inmune para lo cual han desarrollado estrategias defensivas e inmunosupresoras, como la producción de toxinas o cambios estructurales en su

pared celular. Un tema muy común en la literatura de patología de insectos es la producción de toxinas por diversas especies de hongos entomopatógenos. Existe un considerable número de metabolitos secundarios de bajo peso molecular que han sido aislados de patógenos de insectos, muchos de los cuales han demostrado poseer actividad insecticida marginal (Gillespie y Claydon, 1989; Pucheta *et al.*, 2006).

Aunque menos estudiadas, también se ha observado que diferentes macromoléculas de naturaleza proteica tienen un efecto insecticida notable como las proteínas melanizantes de *B.bassiana* (Fuguet y Vey, 2004), una glicoproteína de *B. sulfurescens* y la hirsutellina A, aislada de *Hirsutella thompsonii* (Wei-Zhen *et al.*, 1995).

Los metabolitos insecticidas producidos por hongos tienen varios modos de acción y en muchos casos suelen ser la causa directa de la muerte del insecto, actuando sobre las células especializadas del sistema inmune para evitar su ataque a las estructuras invasivas de los hongos. También, se ha observado que para evitar el ataque del sistema inmune del insecto, los hongos suelen prescindir de la formación de pared celular y se desarrollan como protoplastos, evadiendo su reconocimiento por los hemocitos circulantes en el hemocele (Vinson, 1991).

Cuando los nutrientes provenientes del insecto, particularmente las fuentes de nitrógeno se van agotando, las fases levaduriformes retoman su crecimiento micelial, tal como fue observado en *Entomophthora thripidum*. Por último, cuando las condiciones de humedad y temperatura son las adecuadas, las hifas del hongo emergen nuevamente al exterior del cadáver del insecto, donde esporula. La esporulación ocurre generalmente en cadáveres pero puede también ocurrir en insectos vivos (Ibarra *et al.*, 2006).

Finalmente la dispersión de la spora puede ser un proceso activo o pasivo y depende de las características de la spora y el esporangio. Cada spora puede adherirse o pasar de un invertebrado a otro por dispersión (Borges *et al.*, 2010).

### **2.3.5 Ambiente-hongos entomopatógenos**

El ambiente juega un papel muy importante para que los hongos entomopatógenos desarrollen su micosis estos deben de tener temperaturas y humedades adecuadas para que desarrollen su potencial de virulencia (Pucheta *et al.*, 2006).

Temperatura: la temperatura puede afectar la estabilidad de los patógenos en el almacenamiento, durante las aplicaciones en el campo y en su ocurrencia natural en el agroecosistema. Como los HE no poseen condiciones biológicas para defenderse de las graves variaciones de temperatura, este factor puede ser, muchas veces, limitante para varios microorganismos. De modo general, la baja favorable de temperatura para los diferentes grupos de entomopatógenos varía entre 20 y 30 °C. Sin embargo, existe una temperatura ideal para cada patógeno y para cada fase del ciclo de las relaciones entre este y los hospedantes. La temperatura es uno de los factores abióticos más importantes para los HE, ya que puede afectar la germinación de las esporas, el desenvolvimiento y penetración del tubo germinativo y la colonización y reproducción. Las exigencias térmicas de los hongos son variables en función de la especie, cepa y fase del desarrollo. El desarrollo de la enfermedad fúngica en los insectos puede ser perjudicado por temperaturas superiores a 30 °C (Lecuona, 1996; Hajek, 1997; Pucheta *et al.*, 2006).

Humedad relativa y precipitación: la humedad relativa es un factor de gran importancia, tanto para el hospedante como para el patógeno. Ella es necesaria para las diferentes fases del ciclo de las relaciones entre ambos organismos. Así, ella actúa sobre la germinación, penetración y es indispensable para la reproducción de los HE. Por otro lado, mientras que la temperatura afecta la velocidad del proceso de la enfermedad, la falta de humedad adecuada puede perjudicar a una epizootia. En relación con los hongos, se ha observado que a medida que la humedad relativa disminuye, puede aumentar la temperatura media letal para los conidios. En general varios patógenos no toleran humedades elevadas durante la fase de almacenamiento. La forma y el momento de liberación

de los inóculos al medio pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad a campo, e influyen en ellos los factores climáticos como la humedad relativa y la luz (Lecuona, 1996; Hajek, 1997; Pucheta *et al.*, 2006).

Radiación solar y fotoperiodo: la sensibilidad de los patógenos a la radiación ultravioleta puede variar en función de la especie y cepa del patógeno. Muchos estudios indican que los HE presentan gran sensibilidad a la radiación solar. En líneas generales, el fotoperiodo no constituye un factor limitante para la producción de HE (Lecuona, 1996; Hajek, 1997; Pucheta *et al.*, 2006).

Agroquímicos: la susceptibilidad de los HE a los agroquímicos puede variar de acuerdo con el grupo y cepa del patógeno, con la naturaleza química del producto y con la dosis empleada. Existen sustancias que son letales para los microorganismos, otras poseen efecto fúngico o bacteriostático y finalmente productos a dosis normales y/o sub-letales pueden favorecer su crecimiento, reproducción y virulencia (Lecuona, 1996).

### **2.3.6. *Metarhizium anisopliae***

Este hongo entomopatógeno ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diversos órdenes. Los insectos muertos por este hongo son cubiertos completamente por micelio, el cual inicialmente es de color blanco pero se torna verde cuando el hongo esporula (Monzón, 2001). Presenta una colonia pegada al medio, completamente redonda, de colores oliváceo, amarillento, verdoso, marrón oscuro, dependiendo del aislamiento, con un revés incoloro a marrón, a veces verdoso citrino (figura 3). Los conidióforos nacen del micelio y son irregularmente ramificados con dos a tres ramas en cada septo, miden de 4 a 14 $\mu$  de longitud x 1.5 a 2.5 de diámetro. Las fiálides son cilíndricas en forma de clavo, adelgazados en el ápice, miden de 6 a 13 $\mu$  de longitud y de 2 a 4 $\mu$  de diámetro. Las conidias son unicelulares, cilíndricas y truncadas, formadas en cadenas muy largas, hialinas a verde oliváceo, miden de 3.5 a 9 $\mu$  de longitud x 1.5 a 3.5 $\mu$  de diámetro (Quesada *et al.*, 2004).

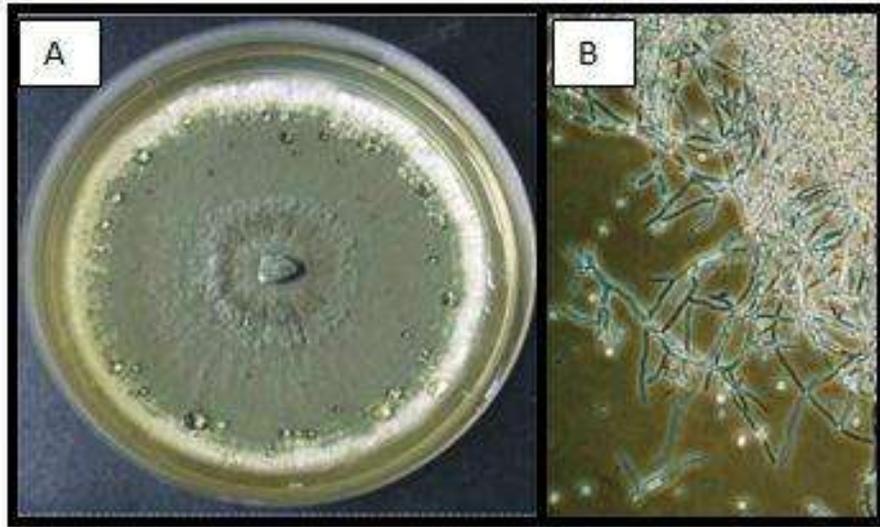


Figura 3.- Morfología macroscópica y microscópica de *Metarhizium anisopliae* (Tomado de Quesada *et al.*, 2004).

### 3. OBJETIVO

Evaluar la eficacia del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* cepa Ma 198 en la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Bovinos de La Huacana Michoacán.

## **4. Materiales y Métodos**

### **4. 1 Reproducción del hongo *Metarhizium anisopliae***

El cultivo del hongo se realizó en el laboratorio del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. La cepa Ma198 de hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* está depositada en la Colección de Hongos Entomopatógenos de la Universidad de Colima.

Los hongos fueron cultivados en agar dextrosa Sabouraud (SDA), con 1% de extracto de levadura y con 500 ppm de cloranfenicol, incubados en 25°C y 70% de humedad relativa durante tres semanas (Ramírez, *et al.*, 2012) y los conidios fueron extraídos para obtener una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml, la cual se diluyó en 0.1% de Tween 80 y se agitaron durante 3 minutos.

En la reproducción de los hongos se utilizaron bolsas de polipapel con 250g de arroz entero previamente lavado y tratado con 500 ppm de cloranfenicol, se esterilizó en autoclave durante 15 minutos. Se inoculó cada bolsa con 10ml de suspensión con conidios, y se incubaron a una temperatura de 25°C y 70% de humedad relativa durante 21 días (Ramírez, *et al.*, 2012).

Para la recolección de los conidios se utilizó tierra de diatomea, la cual se agregó a cada bolsa para separar las esporas del arroz, la separación se hizo mediante dos recipientes grandes y en medio se colocó un cedazo el cual permitió el paso de las esporas únicamente, una vez colectadas las esporas se almacenaron en refrigeración hasta su uso (Valdez, 2013).

### **4. 2 Cuantificación de conidios**

Los conidios se colectaron en una dilución de agua destilada estéril y Tween 80, se cuantificaron en una cámara de Neubauer y mediante la dilución se logró la concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml, misma que se utilizó para asperjar los bovinos.

### **4. 3 Descripción de la zona de estudio**

#### **4. 3. 1 Localización**

El estudio se realizó en los Ranchos Agua Caliente, El Cobano, La Mesa, El Pantano situados en el municipio de La Huacana, Michoacán, ubicado en las coordenadas 18°58' de latitud norte y 101°48' de longitud oeste, a una altura de 480 msnm (INEGI, 2009).

#### **4. 3. 2 Clima**

Su clima es tropical con lluvias en verano y en algunas partes seco estepario. Tiene una precipitación pluvial anual de 800.0 milímetros y temperaturas que oscilan de 10.0 a 54° centígrados y una humedad relativa del 60% (INEGI, 2009).

#### **4. 3. 3 Estructura y manejo del hato**

El hato del rancho Agua Caliente está compuesto por un total de 22 Bovinos, El Cobano 20 Bovinos, La Mesa 22 Bovinos y El Pantano 24 Bovinos, las razas que predominan son: Simmental, Suizo, Beefmaster, Holandés, Charoláis y Brahmán.

Los ranchos manejan un sistema de explotación extensivo, la alimentación del ganado es basada en el consumo directo de pastos nativos y mejorados como llanero, rastrojos de maíz, tanzania, árboles forrajeros y estrella, así como también se administran concentrados de maíz, sorgo y alimentos comerciales. En cada hato los animales se dividieron en dos grupos homogéneos, en uno se utilizó la cepa Ma198 y el otro sirvió como testigo.

#### **Aplicación del tratamiento**

Antes de aplicar los tratamientos, se realizó la identificación de las garrapatas del género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el laboratorio del IIAF mediante la observación al microscopio estereoscópico identificando las partes características como es gnatosoma, posteriormente en los ranchos los animales se encerraron e inmovilizaron, luego fue seleccionado el lado derecho de cada animal del hato, para cuantificar el número de garrapatas visibles con distinción de estadios, desde la cabeza hasta la cola y la cara interna de la cola, esto para poder medir la

eficacia del hongo y el umbral económico que representan cuando el número de garrapatas rebasa a 20 por animal.

Los tratamientos se repitieron cada 15 días, durante 3 veces consecutivos y los conteos cada 8 días, durante 6 veces consecutivos.

Los tratamientos se aplicaron con bombas de aspersión después de las 5 de la tarde a una temperatura ambiental de 25°C en promedio. Los grupos con el tratamiento se asperjaron con la suspensión de conidias de hongo *Metarhizium anisopliae* a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/ml. Se utilizaron 10 g de esporas para 20 l de agua y 20 ml de Inex-A. Al grupo testigo se le aplicó 1 ml de Inex-A por cada l de agua. El baño se realizó a favor del viento en contra de la dirección del pelo.

#### **4. 3. 4 Análisis estadístico**

Las garrapatas adultas y juveniles del grupo tratado con la cepa Ma198 y testigo fueron contabilizados y comparadas usando el modelo Lsmeans para ver las diferencias a través de los conteos entre grupos (SAS). Se consideró un nivel de significancia de  $P > 0.0001$ .

### **5. Resultados y Discusión**

Se encontró un efecto del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* cepa Ma 198 en el control de las garrapatas ( $P < 0.0001$ ), con lo cual se puede considerar que el hongo entomopatógeno *M. anisopliae* cepa Ma 198 es capaz de reducir las poblaciones de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, en condiciones de pastoreo, ya que en todos los hatos tratados con Ma 198 hubo una reducción de garrapatas.

En el hato Agua Caliente al inicio del experimento, al grupo de animales a los que se le aplicó *M. anisopliae* Ma 198, tuvieron un promedio de  $28.93 \pm 4.86$  garrapatas por animal, al término de la tercera aplicación finalizaron con una carga de garrapatas de  $9.20 \pm 4.86$ . La eficacia que se obtuvo fue de 68.2 %. Mientras que en el grupo testigo de ese mismo hato, se observó un aumento de la

población de garrapatas por animal, al inicio mostraron  $20.57 \pm 4.90$  garrapatas por animal, terminando con carga de  $24.87 \pm 4.90$  garrapatas (Figura 4 y cuadro 1).

Grupo con Tratamiento				Grupo Testigo		
Baño	Conteo	Promedio $\pm$ E.E	Rango	Conteo	Promedio $\pm$ E.E	Rango
1	1 y 2	$28.93 \pm 4.86$	156-2	1 y 2	$20.57 \pm 4.90$	40-8
2	3 y 4	$19.75 \pm 4.86$	82-2	3 y 4	$23.07 \pm 4.90$	46-6
3	5 y 6	$9.20 \pm 4.86$	20-2	5 y 6	$24.87 \pm 4.90$	50-8

Cuadro 1.-Promedio de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* del hato Agua Caliente en el grupo tratado con Ma 198 y en el grupo Testigo.

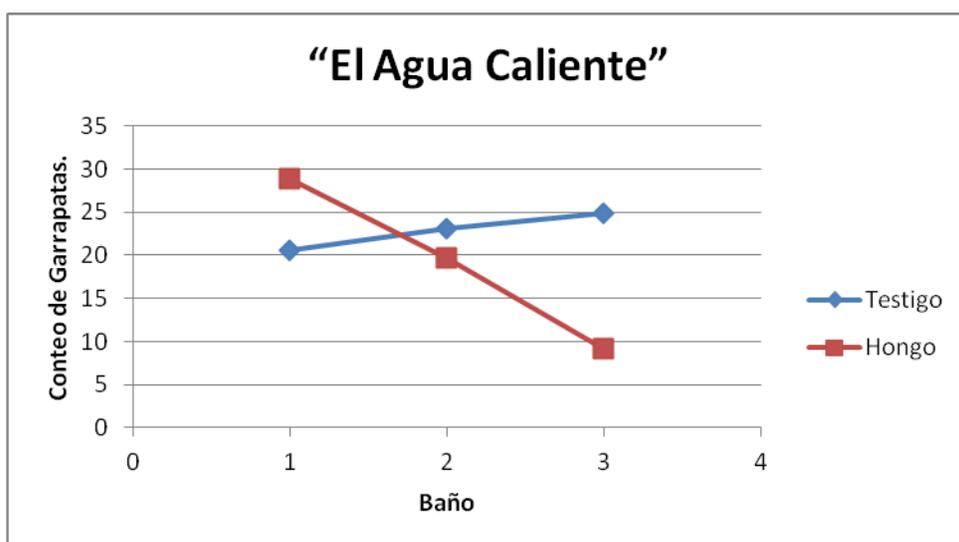


Figura 4.- Comparación de la carga de garrapatas del hato Agua Caliente entre grupo tratado con Ma 198 y el testigo.

En hato El Cobano se observó el número promedio de garrapatas y el efecto del hongo Ma 198, a partir de la primera aplicación del tratamiento hasta el final del experimento se encontró una disminución en la carga de garrapatas en los animales tratados con Ma 198, donde se tuvo una eficacia del 92 %. La carga inicial fue de  $19.21 \pm 4.91$  y  $23.50 \pm 5.05$  garrapatas promedio por animal para los tratamientos con Ma 198 y testigo respectivamente. Posterior a la tercera aplicación, el ganado tratado con Ma 198 registró una carga de garrapatas de 1.53

y el grupo testigo finalizó con una carga de garrapatas de 26.80 en promedio por animal (Cuadro 2 y Figura 5).

Grupo con Tratamiento				Grupo Testigo		
Baño	Conteo	Promedio $\pm$ E.E	Rango	Conteo	Promedio $\pm$ E.E	Rango
1	1 y 2	19.21 $\pm$ 4.91	96-2	1 y 2	23.50 $\pm$ 5.05	40-16
2	3 y 4	9.28 $\pm$ 4.88	64-2	3 y 4	32.70 $\pm$ 5.05	60-18
3	5 y 6	1.53 $\pm$ 4.88	16-2	5 y 6	26.80 $\pm$ 5.05	48-12

Cuadro 2.-Promedio de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* del hato El Cobano en el grupo tratado con Ma 198 y en el grupo Testigo.

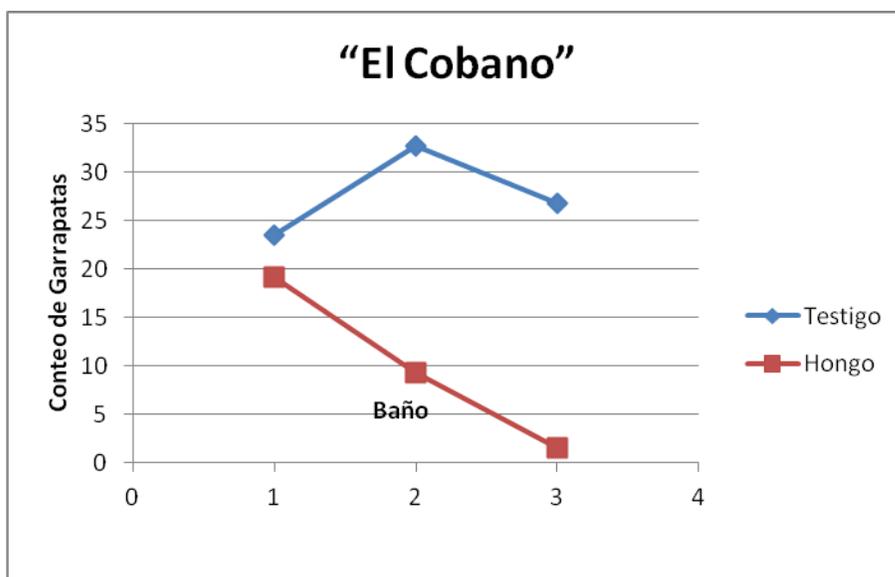


Figura 5.- Comparación de la carga de garrapatas del hato El Cobano entre grupo tratado con Ma 198 y el testigo.

En el hato La Mesa, la carga inicial fue de 57.76  $\pm$  4.80 y 38.46  $\pm$  5.05 garrapatas promedio por animal para los tratamientos con Ma 198 y testigo respectivamente. A la tercera aplicación, el ganado tratado con Ma 198 se le registró una carga de garrapatas 11.12  $\pm$  4.80 y al grupo testigo una carga de 46.16  $\pm$  5.05 en promedio por animal. Mostrando una eficacia el Ma 198 de 80.75 % (Cuadro 3 y Figura 6).

Grupo con Tratamiento				Grupo Testigo		
Baño	Conteo	Promedio $\pm$ E.E	Rango	Conteo	Promedio $\pm$ E.E	Rango
1	1 y 2	57.76 $\pm$ 4.80	152-6	1 y 2	38.46 $\pm$ 5.05	102-18
2	3 y 4	28.94 $\pm$ 4.80	104-2	3 y 4	41.66 $\pm$ 5.05	90-24
3	5 y 6	11.12 $\pm$ 4.80	34-2	5 y 6	46.16 $\pm$ 5.05	88-26

Cuadro 3.-Promedio de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* del hato La Mesa en el grupo tratado con Ma 198 y en el grupo Testigo.

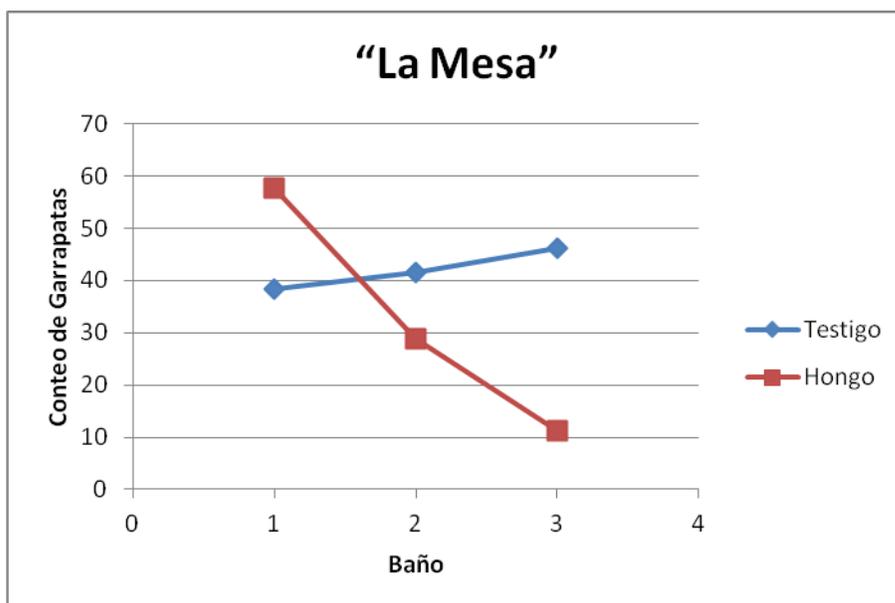


Figura 6.- Comparación de la carga de garrapatas del hato La Mesa entre grupo tratado con Ma 198 y el testigo.

En el hato El Pantano, la carga inicial fue de 43.12  $\pm$  4.72 y 24.98  $\pm$  5.12 garrapatas promedio por animal para los tratamientos con Ma 198 y testigo respectivamente. A la tercera aplicación, el ganado tratado con Ma 198 se le registró una carga de garrapatas 18.79  $\pm$  4.72 y al grupo testigo una carga de 41.48  $\pm$  5.12 en promedio por animal. Mostrando una eficacia el Ma 198 de 56.65 % (Cuadro 4 y Figura 7).

Grupo con Tratamiento				Grupo Testigo		
Baño	Conteo	Promedio $\pm$ E.E	Rango	Conteo	Promedio $\pm$ E.E	Rango
1	1 y 2	43.12 $\pm$ 4.2	106-2	1 y 2	24.98 $\pm$ 5.12	56-6
2	3 y 4	37.95 $\pm$ 4.72	102-4	3 y 4	36.98 $\pm$ 5.12	72-14
3	5 y 6	18.70 $\pm$ 4.72	58-2	5 y 6	41.48 $\pm$ 5.12	70-20

Cuadro 4.-Promedio de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* del hato El Pantano en el grupo tratado con Ma 198 y en el grupo Testigo.

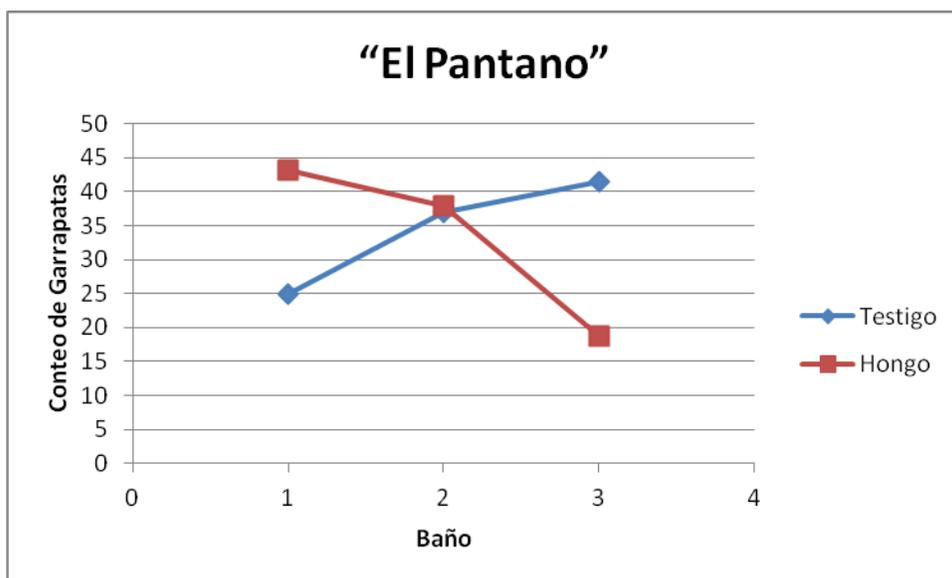


Figura 7.- Comparación de la carga de garrapatas del hato El Pantano entre grupo tratado con Ma 198 y el testigo.

El promedio general ya en conjunto de estos hatos que fueron tratados con Ma 198 pertenecientes al municipio de La Huacana del estado de Michoacán inicia con 37.25 garrapatas por animal y finaliza con un promedio general de 10.13 garrapatas por animal, donde se obtuvo una eficacia del 72.63 %.

Durante el experimento no se identificaron daños en la piel y efectos adversos en vías respiratorias en los animales que recibieron tratamiento, permaneciendo físicamente sanos hasta la conclusión del mismo.

Como se muestra anteriormente en la mayoría de los hatos donde se realizó el experimento, los animales que fueron tratados con Ma 198 al inicio mostraron mayor presencia de garrapatas y conforme pasaron los baños de Ma 198 la cantidad de garrapatas encontradas por animal fue disminuyendo; mientras el grupo Testigo, al comienzo se contó con menor carga parasitaria de garrapatas por animal pero conforme pasaron los baños fue en aumento la población promedio de garrapatas por animal, esto fue debido a que Inex-A no tiene ningún efecto Ixodicida.

La efectividad que mostró el hongo *Metarhizium anisopliae* de la cepa Ma 198 contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en este trabajo, fue de 72.63 % mayor a la reportada por Bazán (2002), donde menciona que hay una eficacia de 56 % en control de garrapatas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en condiciones de establo, la diferencia que hay en la eficacia puede ser debida a que la eficacia del *M. anisopliae* se puede relacionar directamente con los factores climáticos y lugar de procedencia de las cepas, ya que existen cepas que presentan una mayor tolerancia a altas temperatura y exposición a rayos UV, así como al microambiente del animal, como es la temperatura de la piel, ya que se ha demostrado que al incrementarse la temperatura por encima de 34 °C empieza a reducirse la germinación del hongo (Ojeda-Chi et al., 2011).

Por otro lado, Alonso-Díaz *et al* (2007) reportaron una efectividad para combatir la garrapata con *M. anisopliae*, del 40-91.2% en condiciones de campo, lo cual es parecido al porcentaje de efectividad que se muestra en este trabajo, ya que al final del estudio se observó una eficacia a los 38 días post-aplicación en los hatos Agua Caliente de 68.2%, El Cobano de 92%, La Mesa de 80.75% y El Pantano de 56.65% en el control de garrapatas adultas y juveniles en animales en pastoreo, las diferencias en el porcentaje de eficacia que se tienen entre los ranchos puede deberse a las diferencias en la susceptibilidad de las poblaciones de garrapatas (Perinotto *et al.*, 2012), y a la capacidad de modificar el exoesqueleto lo cual inhibe o retarda la penetración del hongo (Alonso-Díaz *et al.*, 2006). También pudiera deberse a que existe una proporción de la población de garrapatas que no fueron

expuestas a los tratamientos llamada población refugio (FAO, 2003), que durante los tratamientos no estaban presentes y posteriormente infestaron a los bovinos.

En Yucatán, *M. anisopliae* presentó una eficacia que van del 30.9 a 87.7 % para el control de garrapatas adultas en infestaciones naturales de bovinos, siendo más evidente en los días 7 y 14 del segundo y tercer tratamiento (Rodríguez-Alcocer *et al.*, 2014), este estudio en los hatos, a los 7 días post aplicación en la carga inicial de garrapatas se obtuvo una eficacia del 36.64%, con lo cual es similar al estudio reportado en Yucatán.

En algunos municipios del estado de Michoacán el ganado demuestra una decreciente población de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que han sido sometidas a la aplicación de Ma198 similar en infestaciones naturales, donde se obtuvo una eficacia del 95 a 100% de efectividad en huevos de *Rhipicephalus Boophilus microplus* y 92.5% de efectividad en garrapatas adultas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Valdez, 2013), con lo cual los resultados de este trabajo están por debajo de los rangos que registró Valdez (2013).

## **6. Conclusión**

El Hongo *Metarhizium anisopliae* de la cepa Ma 198 contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* mostró que es capaz de reducir la población garrapata ya que su eficacia es del 72.63 % en el municipio de La Huacana, mostrando que hay una disminución de la población de las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

El hongo representa en el municipio una alternativa para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; sin embargo, es necesario realizar más estudios enfocados a mejorar la eficacia del hongo en condiciones de campo e incluirlo dentro del programa de control integral de garrapatas, para reducir la dependencia de los ixodicidas.

## 7. Bibliografía

Aguirre, E.J; Sobrino, L.; Santamaría, V.M.; Aburto, S.; Roman, E.; Hernández, M.; Ortiz, M. y Ortiz, N.A. 1986. Resistencia de garrapatas en México. En el Seminario Internacional de Parasitología Animal, Memorias. Cuernavaca, Morelos, México. p. 282-306.

Alonso-Díaz, M.A.; Rodríguez-Vivas, R.I. y Fragoso-Sánchez H. 2006. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. Archivos Medicina Veterinaria.38:105-113.

Alves, S. B. y Pereira, R. M. 1989. Producao de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. E. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Em bandejas.Ecosistema, Espiritu Santo do Pinhal. (14): 188-192.

Barandika, I. J. F. 2010. Las garrapatas exófilas como vectores de agentes zoonóticos: estudio sobre la abundancia y actividad de las garrapatas en la vegetación, e investigación de la presencia de agentes patógenos en garrapatas y micromamíferos. (Tesis de doctorado). Universidad de León. Facultad de Veterinaria. Madrid, España.

Barrera, J. F.; Rodríguez del Bosque, L. A. y Arredondo-Bernal H 2007. Introducción, filosofía y alcance del control biológico. (eds.). Teoría y aplicación del control biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico México. p 1-18.

Bazán, T. M. 2002. Efecto de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en el control biológico de *Boophilus microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae) en ganado bovino estabulado. (Tesis de maestría).Universidad de Colima, Área de Biotecnología. Tecoman, Colima, México.

Beati, L. y Keirans, J.E. 2001. Analysis of the systematic relationships among tickofthe genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based onmitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequence and morphologi calcharacter. Journal of Parasitology Veterinary. 87(1): 32-48.

Benjamín, M.; Zhioua, E. y Ostfeld, R. 2002. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medicine Entomopathogenic*. 5: 723-728.

Bidochka, M. y Khachatourians, G. 1991. The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 58:106-117.

Borges, D; Díaz, A.O.; Nelis, A. y Gómez, E. 2010. Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. 44(3).pp.49-55.

Bustillo, A. 2001. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. Seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá, pp. 30-53.

Carrillo-Rayas, M. T. y Blanco-Labra, A. 2009. Potencial y Algunos de los Mecanismos de Acción de los Hongos Entomopatógenos para el Control de Insectos Plaga. *Acta Universitaria*. 19:40-49.

Cupp, E. W. 1991. Biology of ticks. *Veterinary Clinics of North America*. 21 (1):1-26.

Charnley, A.K., 1992. Mechanism of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. In: Lomer, C.J., C. Prior (eds.), *Biological control of locusts and grasshoppers*. Melkshan, UK:CAB International. pp. 191-190.

Cortés, J.A. 2010. Cambios en la distribución y abundancia de las garrapatas y su relación con el calentamiento global. *Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 57:65-75.

Da Costa G., Sarquis M., De Moraes A. y Bittencourt, V. 2002. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* from *Boophilus*

*microplus* tick (Canestrini, 1887); in Rio de Janeiro State, Brazil. Mycopathol. 4: 207-209.

Da Silva, I., Pohl, P. y De Freitas, D. 2005. Caracterización de resistencia para acaricidas en garrapatas *B. microplus*. Acta Scientiae Veterinarian. 109-117.

Davey, R.B., Ahrens, E.B. y George, J.E. (1997). Comparative effectiveness of coumaphos treatments applied by different methods for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Journal of Agricultural Entomology. 14(1):45-54.

Davey, R.B. y George, J.E. 1999. Efficacy of coumaphos applied as a dip for control of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. Journal of Economic Entomology. 92(6): 1384-1391.

De la Fuente, J., Estrada-Pena, A., Venzal, J.M., Kocan, K.M., Sonenshine, D.E. 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. Frontiers in Bioscience. 13:6938-6946.

Delgado, P. A. M.; Murcia-Ordoñez, B. 2011. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. Ambi-Agua, Taubaté. 6: 2. p.77-90.

Devotto L., Gerding M., France A. 2003. Hongos entomopatógenos. (Online). [www.inia.cl/cobertura/quilamapu/bioleche/BOLETIN23.html](http://www.inia.cl/cobertura/quilamapu/bioleche/BOLETIN23.html) [Consulta: 8 septiembre, 2015].

Domínguez-García, D. I.; Rosario-Cruz, R.; Almazán-García, C.; Saltijeral, O. J. A.; 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. 12:2181-192.

Fan, Y.; Fang, W.; Guo, S.; Pei, X.; Zhang, Y.; Xiao, Y.; Li, D.; Jin, K.; Bidochka, M.J. y Pei, Y. 2007. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. Applied and Environmental Microbiology. 73:295-302.

FAO. 2003. (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. [En línea]. <http://www.fao.org/docrep/006/y4813s/y4813s03.htm> [Consulta: 28 de octubre de 2015].

FAO.2009.The State of Food and Agriculture: Livestock in the balance. FAO, Rome.

Falk-Vairant, J.; Guerin, P M.; Bruyne, M y Rohrer, M. 1994. Some observations on mating y fertilization in the cattle tick *Boophilus microplus*. Medical and Veterinary Entomology. (8):101-103.

Fernandes, E.K.K. yBittencourt, V.R.E.P. 2008. Entomopathogenic fungi against South American tick species. Experimental of Applied Acarology 46: 71-93.

Fernades, E. K.K.; Bittencourt, V. R.E.P. y Roberts, D.W. 2011.Perspectives on thepotential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. SciVerse Science Direct. 130: 300–305.

Fernández-Ruvalcaba, M.; Zhiouab, E. y García, V.Z. 2005. Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Boophilus microplus* sensible y resistente a los organofosforados. Técnica Pecuaria en México 43(3): 433-440.

Fuguet, R.; Théraud, M. y Vey, A 2004. Production *in vitro* of toxic macromoleculesby strains of *Beauveria bassiana*, and purification of a chitosanase-likeprotein secreted by a melanizing isolate. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 138:149-161.

Fuguet, R. y Vey, A. 2004. Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria* spp. *in vivo* studies. Journal of Invertebrate Pathology 85:152-167.

Garris, G I. 1991. Control of ticks. Veterinary Clinics of North America. 21:173-183.

Genouvrier, B.J. 2013. Estudio epidemiológico de las enfermedades de las garrapatas en ganado: predicciones de la distribución de garrapatas. (Tesis de doctorado). Universidad de Lyon, Medicina-Farmacología. Lyon Francia.

Gillespie, A.T. y Claydon, N. 1989. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Science*. 27:203-215.

González-Cerón, F.; Becerril-Pérez, C.M.; Torres-Hernández, G. y Díaz-Rivera, P. 2009. Garrapatas que infestan regiones corporales del bovino criollo lechero tropical en Veracruz, México. *Revista Agrociencia*.43: 11-19.

González, R.U.A. 2007. Dinámica de la garrapata (*Boophilus microplus*) en el municipio de siuna, región autónoma del atlántico norte (raan). (Tesis de licenciatura) Universidad Nacional Agraria, Facultad de Ciencia Animal Departamento de Medicina Veterinaria. Managua, Nicaragua.

Guédez, C.; Castillo, C.; Cañizales, L. y Olivar, R. 2008. Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. Trujillo – Venezuela. 13: 50 – 74.

Guo, X.; Xu, Q.; Harmon, M. A.; Jin, X.; Laudet, V.; Mangelsdorf, D. y Palmer, M. J. 1998. Isolation of two functional retinoid x receptor subtypes from the ixodid tick, *Amblyomma americanum* (L.). *Molecular and Cellular Endocrinology*. 139:45-60.

Gutierrez, T. C. A. 2013. Caracterización parcial de secuencias ESTs codificantes de proteínas de superficie celular, con potencial inmunogénico, en la garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. (Tesis de licenciatura). Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Guadalajara, Jalisco, México.

Ghosh, S.K y Nanda, S.K. 1997. Therapeutic efficacy of butox (Deltamethrin) against cattle tick, *Boophilus microplus* in Tripura. *Indian Veterinary Journal*. 74(3): 250-251.

Hajek, A.E. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Advances in Microbial Ecology*.15: 193-249.

Hassanain, M.; El-Garby, M.; Abdel-Ghaffar, F.; El-Sharaby, A. y Abdel-MegedK.1997. Biological control studies of soft and hard ticks in Egypt. The effect of *Bacillus thuringiensis* varieties of soft and hard tick (Ixodidae). *Parasitology Research*. 3:209-213.

Hokkanen, H. M. T. 1985. Success in classical biological control. *CRC Critical Rev Plant Science*. 3:35-72.

Howarth, F. G. 1991. Environmental impacts of classical biological control. *Annual Review of Entomology*. 36:485-509.

Ibarra, J. E.; Del Rincón, M. C.; Galindo, E.; Patiño, M.; Serrano, L.; García, R.2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48 (2): p. 113-120.

INEGI. 2007. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Censo Agropecuario. Censo Agrícola, Ganadero y Forestal.Tabulado\_Mpio\_VIII\_CAGyF\_30\_16(ExcelMicrosoft).<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/tabuladosbasicos/default.aspx?c=17177&s=est>.

INEGI. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. La Huacana, Michoacán de Ocampo.

Jonsson, N N.; Matschoss, A.; Pepper, P.; Green, P.; Albrecht, M.; Hungerford, J. y Ansell J. 2000. Evaluation of tickGARD Plus; a novel vaccine against *Boophilus microplus*; in lactating Holstein-Friesian cows. *Veterinary Parasitology Journal*. 3: 275-285.

Jonsson N. N. 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology Journal*. 137:1-10.

Jonsson, N.N. y Hope, M. 2007. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology Journal*.1;46:193-198.

Kaaya, G.P.; Seshu-Reddy, K.V.; Kokwaro, E.D. y Munyinyi, D.M.1993. Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Serrabamarcescens* to the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*. *Biocontrol Science Technology*. 3: 177-187.

Kaaya, G.P. y Hassan, S. 2000. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Experimental and Applied Acarology*.12: 913-926.

Kaufman, W. R. y Lomas, L. O. 1996. Male factors in ticks-their role in feeding y Egg development. *Invertebrate Reproduction Development*. 30:191-198.

Kalsbeek, V.;Frandsen, F. and Steenberg, T. 1995. Entomopathogenic fungiassociated with *Ixodes ricinus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*.19: 45-51.

Lawrence, J.A.; Musisi, F.L.; Mfitilodze, M.W.; Tjornehoj, K.; Whiteland, A.P.;Kafuwa, P.T and Chamambala, K.E. 1996. Integrated tick and tick-borne disease control-trials in cross bred dairy cattle in Malawi. *Tropical Animal Health and Production*. 28 (4): 280-288.

Lindquist, E. E.; Krantz, G.W. y Walter D.E. 2009. *A Manual of Acarology*. 3rd ed. Texas Tech University Press, Lubbock, TX, USA. p.807.

Lecuona, R.E. 1996. Control Microbiano. Perspectiva del empleo de hongos entomopatógenos en Argentina. *Congreso de Micología*. Rosario, Argentina. p.47.

Lezama-Gutiérrez, R.; Molina-Ochoa, J.; Rebolledo-Domínguez, O.; Trujillo de laLuz, M.; Gozález-Ramírez, M. y Briceño-Robles S. 1997. Evaluation of entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Anthonomusfulvipes* (Coleoptera: Curculionidae) in organically growth Barbados cherry tres. *Vedalia*. (4):25-29.

Lezama, G. R. y Munguía R R. 1990. Evaluación de cinco sustratos en lamultiplicación masiva de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. y su virulencia sobre *Spodoptera frugiperda* J E. Smith. XII ReuniónNacional de Control Biológico. Colima, Col. México. p 7.

Louda, S. M.; Pemberton, M. T. y Follet, P. A. 2003. Nontarget effects the Achilles heel of biological control retrospective analyses to reduce risk associated with biocontrol introductions. Annual Review of Entomology. 48:365-396.

Meltzer, M.I.1996. A possible explanation of the apparent breed-related resistancein cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestation. Veterinary Parasitology. 67(3-4): 275-279.

Miller, R.J.; Almazán, C.; Ortiz, M.; Davey, R. y George J. A.2008. Survey forfipronil and ivermectine resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected in Northern Mexico and the options for the managements of acaricide resistance ticks with pesticides. Memorias del VI Seminario Internacional de Parasitología Animal2008. Boca del Río Veracruz.

Minson D J. 1990. Forage in Ruminant Nutrition. New York. Academic Press. (1):2-7.

Monzón. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integral de Plagas (Costa Rica). Revista Latinoamericana de Microbiología (63):95-103.

Moorhouse, E. R.; Gillespie, A. T. y A. K. Charnley. 1993. Selection of virulent andpersistent *Metarhizium anisopliae* isolates to control black vine weevil (*Otiorynchus sulcatus*) larvae on glasshouse begonia. Journal of Invertebrate Pathology. 62:47–52.

Morrison. W.I. 1996. Sub unit vaccines for complex tick-borne pathogens- dream orreality. British Veterinary Journal. 152(6): 617-619.

Murrell, A. N.; Campbell, J.H. y Barker, S. C. 2000. Phylogenetic analysis of the rhipicephalina ticks indicates that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 16:1-7.

Myers, J. H.; Smith, J. N. M. y Elkinton, J. S. 1994. Biological control and refuge theory. *Science*. 22:265-811.

Norval, R. A. I.; Sutherst, R. W.; Jorgensen, O. G. y Kerr J D. 1997. Role of Grooming in Biological Control of Ticks. *Medical and Veterinary Entomology*. 11:143-147.

NOM-EM-004-ZOO/1994. Norma Oficial Mexicana de Emergencia.05-19-95. Campaña Nacional contra la garrapata *Bhoophilus* spp. [www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp](http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp)

Ojeda- Chi, M.M.; Rodrigueaz- Vivas, R.I.; Galindo- Velasco, E.; Lezama- Gutiérrez, R. y Cruz- Vázquez, r. 2011. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso de hongo entomópato genético *Metarhizium anisoplae* (Hipoconiales: Clavicipitaceae). *Rev. Mex. Cienc Pecu* 2: 77-192.

Oteo, J.A.; Nava, S.; Sousa, R.; Mattar, S.; Venzal, J.M.; Abarca, K.; Labruna, M.B. y Zavala-Castro, J. 2014. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. *Revista Chilena de Infectología*. 31 (1): 54-65

Pedrini, N.; Crespo, R. y Juárez, M.P. 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 146:124-137.

Pegram, R. G.; Tatchell, R. J. y de Castro J.1993. Tick control, new concepts. *World Anim Rev*. 74/75:2-11.

Perinotto, W. M. S.; Angelo, I. C.; Golo, P. S.; Quinelato, S.; Camargo, M. G.; Sá, F. A. y Bittencourt, V. R. E. P. 2012. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. *Experimental Parasitology*. 130: 257-260.

Polar, P.; Aquino de Muro, M.; Kairo, M.; Moore, D.; Pegram, R.; John, S.A. y Roach-Benn, C. 2005. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. *Veterinary Parasitology*.134:159-167.

Pucheta, D.M.; Flores, M.A.; Rodríguez, N.S. y De la Torre M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *INCI*. (31): 12.

Quesada M.E.; Santos Q.R.; Valverde G.P. y Santiago A.C. 2004. Virulence; Shorizontal transmission; and subletal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: *Blattellidae*). *Jurnal of Invertebrate Pathology*. 87 (1): 51-58.

Quiroz, R.H. (1999) *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Editorial Limusa. México. pp.767-802.

Ramírez, M.A.; Lezama, G.R.; Rebolledo, M.G.; Rebolledo, D.O. 2012. Uso de hongos entomopatogenos *Metarhizium anisopliae*. Seminario de Investigación I. Universidad de Colima, Facultad De Ciencias Biológicas Y Agropecuarias. Octubre 2012.

Rodríguez-Alcocer, U. J.; Rodríguez-Vivas, R. I.; Ojeda, C. M. M.; Galindo-Velasco, E. y Lezama-Gutiérrez, R. L. 2014. Eficacia de la mezcla de dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) para el control de *Rhipicephalus microplus* en infestaciones naturales en bovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 17: 223-229.

Rodríguez-Vivas, R.I.; Quiñones, A.F. y Fragoso SH.2005. Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. En: *Enfermedades de importancia económica en producción animal*. Rodríguez-Vivas, RI editor. México DF: McGraw-Hill-UADY; pp.571-592.

Rodríguez-Vivas, R.I.; Rivas, A.L.; Chowell, G.; Fragoso, S.H.; Rosario, C.R.;García, Z.; Smith, S.D.; Williams, J.J.J. y Schwager, S.J. 2007. Spatial

distribution of acaricide profiles *Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in south eastern Mexico. *Veterinary Parasitology*. 146:158-169.

Rodríguez-Vivas, R.I.; Hodgkinson, J. E. y Trees, A.J. 2009. Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia. Memorias: II Simposio internacional de resistencia a los pesticidas en artrópodos: Perspectivas de la investigación genómica en el control de la garrapata y los patógenos que transmite. Octubre del 2009. p. 10-30.

Rodríguez- Vivas, R. I.; Rosado-Aguilar, J. A.; Ojeda-Chi, M. M.; Pérez-Cogollo, L.C.; Trinidad-Martínez, I. y Bolio-González, M. E. 2014. Control integral de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 1(3): 295-308.

Rosado-Aguilar, J.A.; Rodríguez-Vivas, R.I.; García V. Z.; Fragoso, S. H.; Ortiz-Nájera, A. y Rosario- Cruz, R. 2008. Development of amitraz resistance in field populations of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) undergoing typical amitraz exposure in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*. 152:349-353.

Samish, M.; Ginsberg, H y Glazer I., (2004). Biological control of ticks. *Parasitology*. Vol. 129:S389-S403.

Smith, K. E.; Wall, R. y French, N.P. 2000. The use of entomopathogenic fungi for the control of parasitic mites, *Psoroptes* spp. *Veterinary Parasitology*. (92):97-105.

SAS 2000. Statistical Analysis System. Institute Inc. North Caroline. USA

Simberloff, D. y Stiling, R. W. P. 1996. How risky is biological control? *Ecology*. 77:1965-1974.

Sneh, B. 1991. Isolation of *Metarhizium anisopliae* from insects on an improved selective medium based on wheat germ. *Journal invertebrate pathology*. 58:269–273.

Spickett, A M.; Horak, I.G.; Heyne, H. y Braack, L. E. O. 1995. The effect of severe drought on the abundance of ticks on vegetation and on scrub hares in the Kruger National Park. *Koedoe*. (38):59-64.

Taylor, M. A.; Coop, R. L, y Wall, R.L. 2007. *Veterinary Parasitology*. Thrid edition. Oxford, U.K: Blackwell. 34:317-327.

Téllez-Jurado, A.; Cruz, R.M.G.; Mercado, F.Y.; Asaff, T.A. y Arana-Cuenca, A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*. 30: 73-80.

Valdez, M.E. 2013. Evaluación de la eficacia de *metarhizium anisopliae* (metsch.) sor. en garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* en ganado bovino de tres municipios de michoacán. (Tesis de Maestría).Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Morelia, Michoacán, México.

Vega, M.1991. Current importance of cattle haemoparasite diseases. In: Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Morelos, México. p.144-150.

Vinson, S.B. 1991. Supression of the insect immune system by parasitic Hymenoptera. In: Pathak, J.P.N. (Ed.), *Insect Immunity*. Dordrecht, Bostonand London: Kluwer Academic Publishers. pp.171-187.

Voltzit, O.V. 1996. Functional morphology of support-fixation apparatus in the family ixodidae (Acarina). *Jurnal of Genral Biology*. 57(4): 469-489.

Ward, M. D.; Madison, S.L.; Sailstad, D.M.; Gavett, S.H. y Selgrade M K. 2000. Allergen-triggered airway hiperresponsiveness and lung pathology in mece sensitized with the biopesticide *Metarhizium anisopliae*. *Toxic*. (143):141-154.

Wei-Zhen, L.; Boucias, D.G. y McCoy, C.W. 1995. Extraction and characterization of the insecticidal toxin Hirsutellin A producedby *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii*. *Experimental Mycology* 19:254-262.

