



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

“Aislamiento de suelos, identificación molecular y efecto acaricida *in vitro* de hongos entomopatógenos nativos del trópico mexicano contra la garrapata *Rhipicephalus microplus*”

T E S I S

Que para optar por el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

Agustín Fernández Salas

TUTOR PRINCIPAL:

Miguel Ángel Alonso Díaz

Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical, FMVZ, UNAM

COMITÉ TUTORAL:

Rogelio Alejandro Alonso Morales

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Roberto Lezama Gutiérrez

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

**DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi padre Agustín, a mi madre Hermelinda y a mi hermana Elvia, que son más fuertes que todas las personas del mundo que yo he conocido y que su apoyo hacia mi persona nunca ha conocido limitaciones.

A mi siempre compañera y sostén de mi vida Patricia; sin ella mi camino se hubiera desviado hacia la nada. Mil dedicatorias para ti.

A G R A D E C I M I E N T O S

Sin lugar a dudas el agradecimiento más grande es para el Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz, que siempre me ha apoyado en todos aspectos. Ahora el agradecimiento es académico, pero la amistad, orientación, enseñanza y la guía laboral, no tiene precio alguno. Muchas Gracias Doc.

Agradezco infinitamente a la Universidad Nacional Autónoma de México – Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por abrirme sus puertas para cursar mis estudios de doctorado, en especial al personal de posgrado (Maestra Clara, Mercedes, Dra. Marcela, Dr. Librado, Maestra Alicia), que siempre han sido más que amables y su gran apoyo es muy apreciado para mí.

Al personal de CEIEGT-FMVZ-UNAM, absolutamente a todos, que me vieron crecer profesionalmente desde aquel febrero del 2009 y que hasta la fecha me siguen tratando como en casa, ¡Siempre mi casa!

Al CONACyT por brindarme la beca para realizar mis estudios de doctorado.

Al Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales por siempre brindarme su apoyo, consejos y su paciencia en todo este proceso, siempre amable y muy atento hacia mi persona.

Al Dr. Roberto Lezama Gutiérrez por aconsejarme y enseñarme las técnicas para obtener los hongos entomopatógenos, pieza fundamental de este trabajo.

A los miembros de mi jurado: Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú, Dra. María Guadalupe Prado Ochoa y al Dr. Roberto A. Cervantes Olivares, por sus comentarios y aportaciones a la mejora de esta tesis.

Finalmente agradecer al Dr. José Antonio Cervantes Chávez de la FCN-UAQ, por compartir conmigo sus conocimientos y permitirme realizar parte de mis investigaciones en su laboratorio. Sin olvidar a sus alumnos (Eve y Alonso) que me auxiliaron desinteresadamente en todo momento.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue obtener cepas de hongos entomopatógenos (HE) de suelos de unidades de producción bovina (UPB) para ser utilizadas en el control de *Rhipicephalus microplus*. Se muestrearon suelos en 72 UPB del Estado de Veracruz. Se aislaron 59 cepas de *Metarhizium anisopliae*, seis cepas de *Beauveria bassiana*, dos cepas de *Paecilomyces (Isaria) sp.* y una de *Purpureocillium lilacinum* con la técnica de sebo usando *Galleria mellonella*. Los suelos se analizaron químicamente y se tomaron datos de su manejo y características para observar su influencia en los aislamientos. Los hongos fueron identificados molecularmente mediante PCR y se realizaron análisis filogenéticos a las cepas. Los HE fueron evaluados contra larvas y adultas resistentes y susceptibles de *R. microplus* mediante la técnica de inmersión de larvas e inmersión de adultas, respectivamente. *M. anisopliae* fue el HE más común en los suelos, donde se encontró que el porcentaje de materia orgánica, el uso de herbicidas y la altura de la zona de muestreo influyen directamente en la presencia de HE. Nueve cepas de *M. anisopliae* mostraron un porcentaje alto de mortalidad sobre larvas de *R. microplus* en ambas poblaciones y ninguna cepa de *Beauveria bassiana* mostró elevados porcentajes de mortalidad sobre estas mismas. En adultas, nueve cepas de *M. anisopliae* y dos *Beauveria* causaron mortalidades importantes en las garrapatas e inhibieron su oviposición. No se observaron diferencias en la respuesta de las diferentes poblaciones de garrapatas al efecto de los hongos. En conclusión, este estudio demostró que algunas cepas de *M. anisopliae* y de *B. bassiana* pueden ser una alternativa promisoría como control biológico de *R. microplus*, incluyendo aquellas que son resistentes a los acaricidas químicos.

Palabra clave: entomopatógenos, *Metarhizium*, *Beauveria*, resistencia, ganado, garrapatas, *Rhipicephalus*.

ABSTRACT

The objective of the present study was to obtain strains of entomopathogenic fungi (EF) from soils of cattle farms (CF) to be used in the control of *Rhipicephalus microplus*. Soils were sampled in 72 CF from the State of Veracruz, Mexico. 59 strains of *Metarhizium anisopliae*, six strains of *Beauveria bassiana*, two strains of *Paecilomyces (Isaria) sp.* and one of *Purpureocillium lilacinum* were isolated using the bait method with *Galleria mellonella* larvae. Soils were chemically analyzed and data about management and characteristics were taken to observe their influence on the isolates. Fungi were identified by PCR and phylogenetic analyzes were performed on the strains. EF were evaluated against larvae and adult, resistant and/or susceptible, of *R. microplus* by the larval immersion test and adult immersion test, respectively. *M. anisopliae* was the most common EF in soils, where it was found that the percentage of organic matter, the herbicide use and the height of the sampling area influence the presence of the EF. Nine strains of *M. anisopliae* showed a high mortality rate on *R. microplus* larvae in both populations, and no *B. bassiana* strains showed high mortality rates on these same populations. In adults, nine strains of *M. anisopliae* and two of *Beauveria* caused important mortality in ticks and inhibited their oviposition. No differences were observed in the response of the different tick populations to the effect of fungi. In conclusion, this study demonstrated that some strains of *M. anisopliae* and *B. bassiana* may be a promising alternative as biological control of *R. microplus*, including those that are resistant to chemical acaricides.

Keywords: entomopathogenic, *Metarhizium*, *Beauveria*, resistance, cattle, ticks, *Rhipicephalus*.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Garrapatas.....	3
2.2. Garrapatas en México.....	3
2.3. <i>Rhipicephalus microplus</i>	4
2.4. Distribución de <i>Rhipicephalus microplus</i> en México.....	5
2.5. Ganadería bovina en el estado de Veracruz, México.....	6
2.6. Ciclo biológico de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i>	7
2.6.1. Fase de vida libre.....	7
2.6.1.1. Preoviposición o Protoquia.....	7
2.6.1.2. Oviposición u Ootoquia.....	7
2.6.1.3. Post-oviposición o Metatoquia.	8
2.6.1.4. Incubación.....	8
2.6.1.5. Eclosión.....	8
2.6.1.6. Fase de encuentro.....	8
2.6.2. Fase de vida parasitaria.....	9
2.7. Lesiones.....	10
2.8. Signos.....	10
2.9. Diagnóstico.....	10

2.10. Dinámica poblacional de <i>Rhipicephalus microplus</i> en México.....	11
2.11. Principales zonas en el bovino donde se encuentra <i>R. microplus</i> ..	12
2.12. Importancia económica de <i>Rhipicephalus microplus</i>	14
2.13. Métodos para el control de <i>Rhipicephalus microplus</i>	14
2.13.1. Control químico.....	15
2.13.2. Mecanismo de acción de los acaricidas químicos.....	15
2.13.2.1. Inhibidores de la acetilcolinesterasa.....	15
2.13.2.2. Antagonistas del receptor GABA en el canal cloro.....	15
2.13.2.3. Moduladores del canal de sodio.....	15
2.13.2.4. Agonistas del receptor de octopamina.....	16
2.13.2.5. Moduladores alostéricos de los canales de cloro ligados a los receptores glutamato (GluCl).....	16
2.13.2.6. Inhibidores del crecimiento y desarrollo.....	16
2.13.2.7. Inhibidores de la biosíntesis de quitina.....	17
2.13.2.8. Efectores sobre los receptores del GABA.....	17
2.14. Resistencia de <i>Rhipicephalus microplus</i> a los acaricidas químicos.	17
2.15. Mecanismos de resistencia química de <i>R. microplus</i>	17
2.15.1. Detoxificación metabólica.....	18
2.15.2. Modificación del sitio de acción.....	18
2.15.3. Disminución de la absorción química.....	19

2.15.4. Resistencia por conducta.....	20
2.16. Multi-resistencia.....	20
2.17. Resistencia de <i>R. microplus</i> en México.....	21
2.18. Resistencia de <i>R. microplus</i> en Veracruz.....	21
2.19. Control no químico.....	22
2.19.1. Uso de razas resistentes.....	22
2.19.2. Manejo de praderas.....	22
2.19.3. Vacunas.....	23
2.19.4. Control biológico.....	23
2.19.5. Hongos entomopatógenos.....	24
2.19.5.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin.....	25
2.19.5.2. <i>Cordyceps (Beauveria) bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin.....	26
2.19.5.3. <i>Isaria (Paecilomyces) sp.</i> (Holmsk.).....	26
2.19.5.4. <i>Lecanicillium (Verticillium) lecanii</i> (Zimmerman) Viegas....	27
2.19.5.5. <i>Nomuraea rileyi</i> (Farlow) Samson.....	27
2.20. Mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos.....	28
2.21. Evaluación de hongos entomopatógenos contra <i>R. microplus</i>	30
2.22. Factores que afectan el efecto de los hongos entomopatógenos....	31
2.22.1. Factores ambientales.....	31
2.22.2. Factores bióticos y abióticos del bovino.....	32

2.22.3. Defensas fisicoquímicas de las garrapatas.....	32
2.22.4. Defensas inmunológicas.....	33
2.22.5. Edad de las garrapatas.....	34
2.22.6. Estado nutricional de las garrapatas.....	34
2.22.7. Estado biológico.....	35
2.22.8. Origen de las garrapatas.....	35
III. JUSTIFICACIÓN.....	36
IV. HIPÓTESIS.....	37
V. OBJETIVOS.....	38
5.1. Objetivo General.....	38
5.2. Objetivos específicos.....	38
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
6.1. Área de estudio.....	39
6.2. Muestreo de suelos.....	42
6.3. Datos del área de muestreo y manejo de suelos en las UPB.....	43
6.4. Transporte de las muestras de suelo.....	45
6.5. Manejo de suelos en laboratorio y aislamiento de hongos.....	45
6.6. Identificación morfológica de los hongos aislados.....	46
6.7. Análisis químico y físico de los suelos.....	47
6.8. Reproducción y almacenamiento de los HE.....	47

6.9. Identificación molecular de los hongos entomopatógenos.....	48
6.9.1. Obtención del ADN de los hongos entomopatógenos.....	48
6.9.2. Amplificación del ADN de los hongos entomopatógenos.....	49
6.10. Efecto acaricida <i>in vitro</i> de los HE contra dos poblaciones de garrapatas adultas de <i>R. microplus</i>	50
6.11. Efecto acaricida <i>in vitro</i> de los HE contra larvas de <i>R. microplus</i>	51
6.11.1. Obtención de las larvas de <i>R. microplus</i>	51
6.11.2. Efecto de HE sobre la mortalidad de larvas de <i>R. microplus</i>	51
6.12. Análisis estadístico.....	52
VII. RESULTADOS	54
7.1. Hongos entomopatógenos aislados de los suelos de las UPB.....	54
7.2. Análisis químico de los suelos de las UPB.....	57
7.3. Efecto de los componentes químicos y físicos de los suelos sobre la ausencia o presencia de hongos entomopatógenos.....	69
7.4. Factores asociados a la presencia o ausencia de HE en las UPB....	74
7.5. Identificación morfológica de los HE aislados de las UPB.....	76
7.5.1. Morfología de <i>Beauveria bassiana</i>	76
7.5.2. Morfología de <i>Metarhizium anisopliae</i>	76
7.5.3. Morfología de <i>Paecilomyces sp.</i>	77
7.6. Identificación molecular de los HE aislados de las UPB.....	77

7.7. Análisis filogenético de los HE aislados de las UPB.....	78
7.7.1. Análisis filogenético de <i>Beauveria bassiana</i>	78
7.7.2. Análisis filogenético de <i>Metarhizium anisopliae</i>	81
7.8. Efecto garrapaticida de los HE sobre teleóginas de <i>R. microplus</i> , sobre su reproducción, cálculo de las concentraciones letales 50 y 99% y diferencias en la respuesta de las garrapatas resistentes y susceptibles a los HE.....	81
7.9. Efecto garrapaticida de los HE sobre larvas de <i>R. microplus</i> resistentes o susceptibles.....	81
7.10. Diferencia en el efecto de mortalidad de los HE sobre dos poblaciones de larvas de <i>R. microplus</i> ; resistentes y susceptibles.....	82
VIII. DISCUSIÓN.....	88
8.1 Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelos de unidades de producción bovina en el trópico.....	88
8.2. Análisis físico-químicos de los suelos de las UPB.....	90
8.3. Factores geoclimáticos y de manejo de suelos como causas de ausencia/presencia de HE.....	91
8.4. Identificación morfológica y molecular de los HE y su relación filogenética.....	93
8.5. Efecto de los HE sobre la mortalidad, la reproducción de adultas de <i>R. microplus</i>	96
8.7. Efecto de los HE sobre la mortalidad de larvas de <i>R. microplus</i>	96
8.8. Respuesta de dos poblaciones de <i>R. microplus</i> (resistente y	

susceptible) al efecto acaricida de los HE.....	97
IX. CONCLUSIONES.....	99
X. BIBLIOGRAFÍA.....	100
XI. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS.....	129

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Dinámica poblacional de <i>Rhipicephalus microplus</i> y <i>Amblyomma cajennense</i> en el año y entre estaciones.....	12
Cuadro 2. Características geo-climáticas promedio de los 12 municipios considerados para los muestreos de suelos en ranchos bovinos de Veracruz, México.....	39
Cuadro 3. Nombre, municipio, altitud y localización GPS de las UPB para el muestreo de suelos en busca de hongos entomopatógenos.....	41
Cuadro 4. Características (variables) del manejo de suelos de las UPB consideradas como posibles factores asociados a la presencia de los hongos entomopatógenos en UPB de Veracruz, México.....	44
Cuadro 5. Municipio y Unidad de Producción Bovina en donde se aisló cada cepa de HE.....	56
Cuadro 6. Componentes químicos de las muestras de suelos obtenidas de las UPB de Veracruz, México.....	58
Cuadro 7. Factores asociados a la presencia/ausencia de hongos entomopatógenos aislados de suelos de UPB en Veracruz, México.....	74
Cuadro 8. Mortalidad de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> resistentes (R) y susceptibles (S) a los acaricidas expuestas a <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> (1×10^8 conidia/ml) durante 20 días.....	83
Cuadro 9. Efecto de mortalidad de los hongos entomopatógenos <i>M. anisopliae</i> y <i>B. bassiana</i> sobre larvas de <i>R. microplus</i> resistentes y susceptibles a los acaricidas químicos.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Géneros de las tres principales familias de garrapatas.....	5
Figura 2. Distribución de <i>Rhipicephalus microplus</i> en México.....	6
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i>	10
Figura 4. Principales zonas en el bovino donde se fija la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> para alimentarse.....	13
Figura 5. Baño por aspersión aplicando grupalmente el acaricida (mala práctica de aplicación).....	13
Figura 6. Resistencia a los acaricidas en garrapatas por detoxificación metabólica (secuestro de moléculas acaricidas).....	18
Figura 7. Resistencia a los acaricidas en garrapatas por modificación del sitio de acción.....	19
Figura 8. Resistencia a los acaricidas en garrapatas por disminución de la absorción de las moléculas químicas.....	20
Figura 9. Modo de acción general de los HE: desde la adherencia hasta la colonización.....	29
Figura 10. Representación esquemática de la situación geográfica del Estado de Veracruz en México y los municipios de muestreo se suelos.....	40
Figura 11. Distribución de hongos entomopatógenos dentro de las UPB por zona de muestreo.....	55
Figura 12. Distribución de hongos entomopatógenos en UPB en 12 municipios de la zona centro-norte de Veracruz, México.....	56
Figura 13. pH de los suelos muestreados de las UPB en Veracruz, México.	63
Figura 14. Porcentaje de materia orgánica de los suelos muestreados de las UPB.....	64
Figura 15. Niveles de nitrógeno encontrados en suelos de las UPB.....	65
Figura 16. Niveles de fosforo encontrados en suelos de las UPB.....	65
Figura 17. Niveles de potasio encontrados en suelos de las UPB.....	66
Figura 18. Niveles de calcio encontrados en suelos de las UPB.....	66

Figura 19. Niveles de magnesio encontrados en suelos de las UPB.....	67
Figura 20. Niveles de cobre encontrados en suelos de las UPB.....	67
Figura 21. Niveles de fierro encontrados en suelos de las UPB.....	68
Figura 22. Niveles de zinc encontrados en suelos de las UPB.....	68
Figura 23. Niveles de manganeso encontrados en suelos de las UPB.....	69
Figura 24. Efecto del pH, materia orgánica (M.O.) y componentes químicos de los suelos en la presencia o ausencia de HE en suelos colectados de UPB.....	71
Figura 25. Frecuencia y distribución de suelos de UPB de acuerdo a su aislamiento o no aislamiento de HE y con respecto al pH, materia orgánica y componentes químicos.....	73
Figura 26. Colonias de <i>Beauveria bassiana</i> creciendo en medios de cultivo.....	76
Figura 27. Colonias de <i>Metarhizium anisopliae</i> creciendo en medios de cultivo.....	77
Figura 28. Árbol filogenético de HE <i>Beauveria bassiana</i> obtenidos de suelos de UPB donde se observa su interrelación con otros <i>B. bassiana</i> aisladas en el mundo.....	79
Figura 29. Árbol filogenético de HE <i>M. anisopliae</i> obtenidos de suelos de UPB donde se observa su interrelación con otros <i>M. anisopliae</i> aisladas en el mundo.....	80

ABREVIATURAS

HE	Hongos entomopatógenos
UV	ultravioleta
G	gramo
T	Temperatura
mm	milímetros
°C	Grados centígrados
ADP	Agar papa y dextrosa
ITS	Espaciadores internos transcritos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
MgCl₂	Cloruro de magnesio
dNTPs	Trifosfato-deoxiribunucleotidos
TAE	buffer tris-acetate-EDTA
PPM	partes por millón
HR	Humedad relativa
V/V	volumen/volumen
PT	post-tratamiento
IER	Índice de eficiencia reproductiva
CL	Concentración letal
Km²	Kilómetros cuadrados

UPB	Unidades de producción bovina
SNC	Sistema Nervioso Central
GABA	Ácido gammaaminobutírico
OF	Organofosforados
PS	Piretroides sintéticos
Am	Amidinas
LM	Lactonas Macrocíclicas
pH	Potencial de hidrógeno
N	Norte
O	Oeste
PP	Precipitación pluvial
Msnm	Metros sobre el nivel del mar
m	Metros
GPS	Posición global satelital
Kg	Kilogramos
L	Litros
ml	Mililitros
μl	Micro litros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
NaCl	Cloruro de Sodio

Rpm	Revoluciones por minute
M	Molar
µm	Micrómetros
N	Nitrógeno
P	Fosforo
K	Potasio
Ca	Calcio
Mg	Magnesio
Cu	Cobre
Fe	Fierro
Z	Zinc
Mn	Manganeso
MO	Material Orgánica
R	Resistente
S	Susceptible
OR	Odds Ratio
s.l.	Sensu lato

I. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son una de las mayores amenazas que enfrenta la ganadería bovina alrededor del mundo, de las cuales destaca *Rhipicephalus microplus*, debido a las serias afectaciones directas e indirectas que provoca a la ganadería bovina de las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Quiroz, 2005; Domínguez-García et al., 2010). Durante décadas, el control de esta garrapata se ha basado en el uso de acaricidas de diferentes familias químicas (Alonso-Díaz et al., 2006); sin embargo, el uso frecuente e irracional de estos productos ha favorecido el desarrollo de resistencia de *R. microplus* a casi todas las moléculas químicas disponibles (Fernández-Salas et al., 2012a y 2012b). Esta resistencia no solo es compleja (multi-resistencia) y está muy diseminada, sino que además contribuye con la presencia de residuos químicos en leche, carne y en el ambiente (Bullman et al., 1996). Todos estos factores negativos para la ganadería han motivado la búsqueda de métodos alternativos de control de garrapatas (Samish et al., 2004; Alonso-Díaz et al., 2006). En este contexto, el control biológico usando hongos entomopatógenos (HE) se ha sugerido como una alternativa promisorio y efectiva para disminuir el uso de acaricidas químicos (Samish et al., 2004; Alonso-Díaz et al., 2007a; Ojeda-Chi et al., 2010).

Los HE que han mostrado mejor efecto para controlar a *R. microplus* en estudios *in vitro* son del género *Metarhizium*, *Beauveria*, *Isaria* y *Verticillium*; sin embargo, en condiciones de campo los estudios que existen han reportado inconsistencias en su control (Leemon et al., 2008; Amaro et al., 2011). Esta disminución se ha atribuido principalmente al estrés medioambiental que sufren los HE por efecto de la temperatura (T), humedad relativa (HR) y los rayos UV (Samish et al., 2004; Li y Feng, 2009), condiciones que en las zonas tropicales de México, pueden ser extremas. Considerando esto, el hallazgo de cepas de HE con la capacidad de soportar estas condiciones ambientales pueden aumentar la efectividad en las aplicaciones en campo.

También, considerando la expandida y compleja resistencia química de las garrapatas, es deseable que los HE utilizados tengan efectividad contra las

poblaciones resistentes y sus variados niveles de resistencia. Esto es importante, debido a que las poblaciones de garrapatas a controlar en condiciones naturales manifiestan diferentes comportamientos toxicológicos en respuesta a los acaricidas (Fernández-Salas et al., 2012b).

Por otro lado, cuando los HE se utilizan como control biológico, es importante su correcta identificación y caracterización. Es común que la identificación se realice mediante la observación de características morfológicas y culturales, no obstante, esta podría no ser suficiente para una caracterización correcta (Pérez-González et al., 2014). Se ha demostrado que muchos hábitats pueden albergar diferentes especies de hongos y diferentes grupos genéticos dentro de estas especies (Meyling et al., 2009; Ormond et al., 2010).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Garrapatas

Las garrapatas son artrópodos arácnidos clasificados en tres familias: la Argasidae (garrapatas blandas, con aproximadamente 193 especies), la Ixodidae (garrapatas duras, con aproximadamente 702 especies) y la Nuttalliellidae, la cual está presente solo en África con una especie identificada (*Nuttalliella namaqua*) y de características intermedias entre las otras dos familias (Guglielmone et al., 2010; Oliver, 1989; Rosario-Cruz et al., 2007). Aproximadamente 80% de todas las garrapatas de importancia veterinaria son de la familia Ixodidae. Estas se fijan sobre la piel del hospedero y se alimentan de su sangre, en ocasiones también del humano. Infestan principalmente al ganado bovino, pero también se pueden encontrar en caprinos, ovinos, equinos, perros, mamíferos silvestres e inclusive aves y reptiles. Las garrapatas presentan variaciones en sus ciclos biológicos, y pueden ser de tres tipos: garrapatas de tres hospederos (por ejemplo *Amblyomma* e *Ixodes*), de dos hospederos (por ejemplo: Algunas *Rhipicephalus* y *Hyalomma*) o de un solo hospedero (*Rhipicephalus* [*Boophilus*] *microplus*) (Holdsworth et al., 2006). Su distribución es cosmopolita y están consideradas como los principales transmisores de agentes microbianos causantes de enfermedades en la ganadería bovina (de la Fuente et al., 2008).

2.2. Garrapatas en México

En México, se han identificado 82 especies de garrapatas tanto en animales silvestres como domésticos (Hoffmann y Lopez-Campos, 2000), siendo *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus* y *Amblyomma cajennense* (que pertenecen a la familia Ixodidae), las de mayor importancia económica y sanitaria. *Rhipicephalus annulatus* se presenta en el norte del país (Coahuila, Nuevo León, Baja California Norte, Durango, Jalisco y el norte de Sinaloa), debido a que sus requerimientos de temperatura y humedad son diferentes en comparación a las otras garrapatas. *Amblyomma cajennense* y *Rhipicephalus microplus* generalmente coexisten en las zonas tropicales y

subtropicales del país (Alonso-Díaz et al., 2012). Además, es importante saber que su distribución está dada, además de la T y la HR, por otros factores como la vegetación, altitud, presencia de hospederos y métodos de control o erradicación de sus poblaciones. Estas garrapatas causan grandes pérdidas económicas en México debido, principalmente, a afectaciones sobre la producción, reproducción, daños a pieles, tratamientos acaricidas y por las enfermedades que transmiten (López, 1980; Vega, 1991). De estas, resalta *R. microplus*, ya que provoca los daños más serios a los bovinos.

2.3. *Rhipicephalus microplus*

R. microplus (garrapata común del ganado) es el ectoparásito hematófago más importante que afecta la ganadería bovina alrededor del mundo. Taxonómicamente está situada dentro del Phylum: Artrópoda, Clase: Arácnida, Orden: Acarina y de la superfamilia Ixodida (Figura 1). Por muchos años esta garrapata estuvo situada taxonómicamente dentro del género *Boophilus*; sin embargo, debido a los recientes avances en la investigación científica molecular, se ha propuesto y aceptado que se incluya a *Boophilus* como un subgénero de *Rhipicephalus*, argumentando que existen suficientes evidencias moleculares que indican una estrecha cercanía filogenética entre ambos géneros (Murrell y Barker, 2003). Actualmente, las garrapatas del complejo *R. microplus* constan de cuatro taxones, llamados *R. australis* (Estrada-Peña et al., 2012), *R. annulatus*, *R. microplus* clado A sensu, *R. microplus* clado B sensu (Burger et al., 2014) and *R. microplus* clado C sensu (Low et al., 2015).

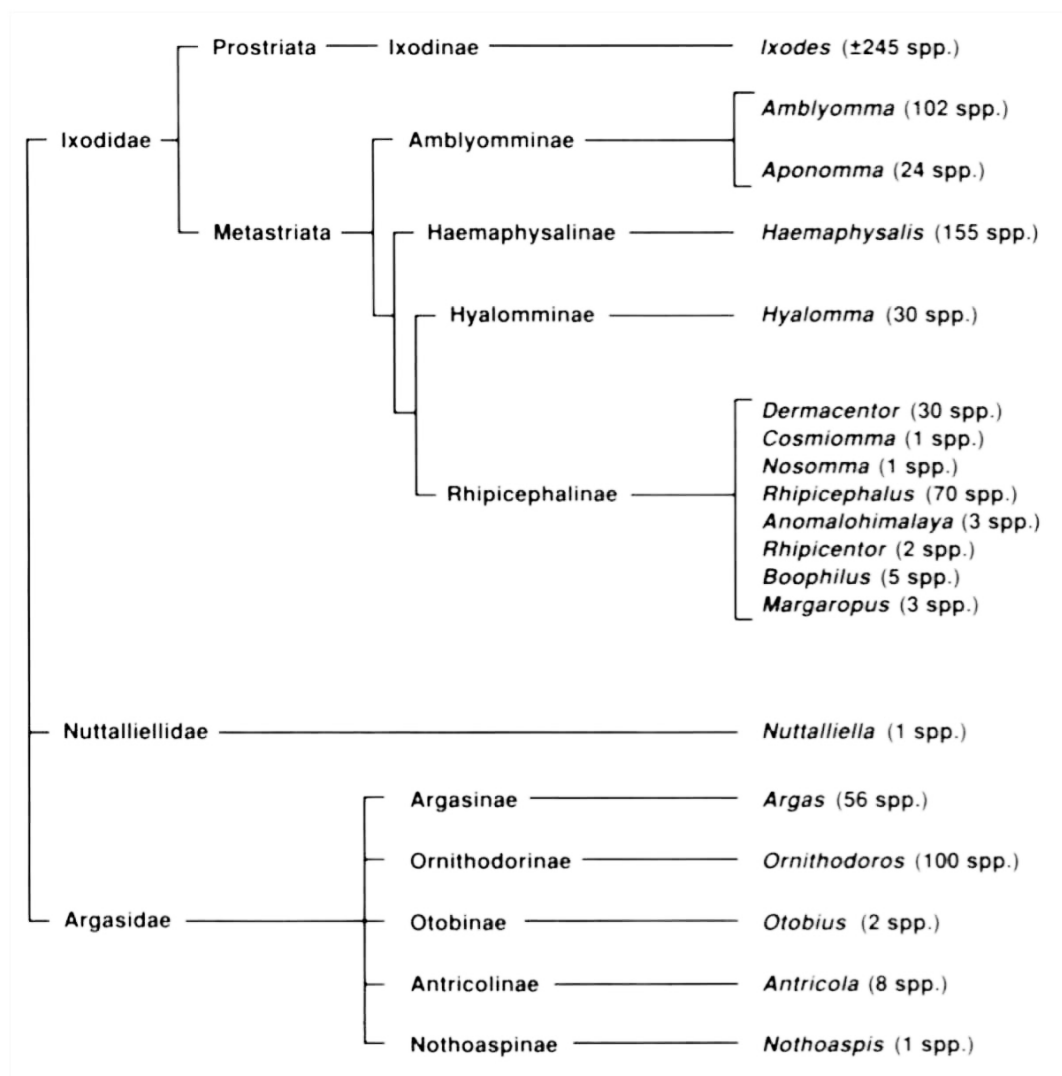


Figura 1. Géneros de las tres principales familias de garrapatas.

2.4. Distribución de *Rhipicephalus microplus* en México

Rhipicephalus microplus tiene una amplia distribución en México (65.96 % del territorio nacional; 1,292, 407.02 km²), principalmente a lo largo de la costa del Golfo de México, la Península de Yucatán y la Costa del Océano Pacífico (Solís, 1991). Se reconoce a los estados de Sonora, Durango, Tlaxcala, Ciudad de México, Aguascalientes, Baja California y Chihuahua (con excepción de los municipios de Morelos, Guadalupe y Calvo) y el norte de Baja California Sur como libres de *R. microplus*, debido a la inapropiada climatología para el desarrollo y

sobrevivencia de esta garrapata (Estrada-Peña, 2001). El resto del país se encuentra casi en su totalidad con presencia y en control de esta garrapata (Figura 2) (SAGARPA-SENASICA, 2016). En las regiones de México donde prevalecen altas infestaciones, generalmente se presentan lluvias regulares, con alta humedad y clima cálido. Sin embargo, como se observa, también pueden encontrarse en zonas con lluvias temporales y sequías bien definidas. En algunos estados como Veracruz, Yucatán y Tabasco se ha reportado su presencia durante todo el año (Alonso-Díaz et al., 2007; Rodríguez-Vivas et al., 2005).

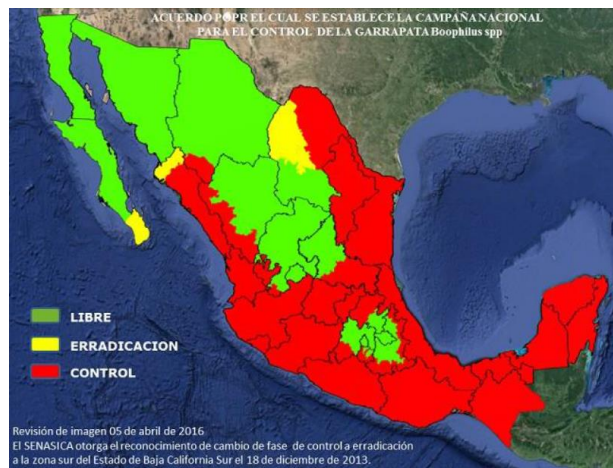


Figura 2. Distribución de *Rhipicephalus microplus* en México (Rojo) (SAGARPA-2011)

2.5. Ganadería bovina en el estado de Veracruz, México

Veracruz es el estado con el mayor inventario ganadero en México con 2,454,171 de bovinos que representan el 10.5 % del inventario nacional. Es el primer productor de carne bovina (14.7 % de la producción nacional total) y el sexto productor de leche (708,230 litros por año) (INEGI, 2010). En el área, la alimentación del ganado se basa en el uso del forraje a través del pastoreo directo y, consecuentemente, el 80% de las enfermedades que afectan a los bovinos son de índole parasitarias. En el estado, las mayores infestaciones por *R. microplus* ocurren durante la época de mayor temperatura y precipitación pluvial (de mayo a septiembre) (Alonso-Díaz et al., 2007).

2.6. Ciclo biológico de la garrapata *Rhipicephalus microplus*

El ciclo de la garrapata *R. microplus* es directo, lo cual quiere decir que pasa sus fases de desarrollo desde larva infectante hasta adulto en un solo hospedero (Quiroz, 2005). Su ciclo está dividido en dos fases: de vida libre y de vida parasitaria (Solís, 1993) (Figura 3).

2.6.1. Fase de vida libre

También conocida como fase no parasitaria. Esta fase inicia con el desprendimiento de la hembra repleta después de alimentarse de su hospedero, hecho que generalmente sucede en la noche o madrugada, hasta la aparición de las larvas en la vegetación o pastura. Durante esta fase suceden cinco etapas del desarrollo de la garrapata: preoviposición o protoquia, oviposición u ootoquia, post-oviposición o metatoquia, incubación y eclosión (Castellanos, 1993).

2.6.1.1. Preoviposición o Protoquia

Después del derribe, la teleógina (garrapata hembra adulta repleta) busca en la pradera lugares húmedos, cálidos y protegidos de los rayos solares para depositar sus huevos. Esta fase dura de 2 a 4 días, en condiciones favorables de humedad (80%) y temperatura (28 - 30°C); no obstante, durante los meses de clima frío puede durar hasta 97 días (Rosario-Cruz et al, 2007).

2.6.1.2. Oviposición u Ootoquia

Este periodo comprende el tiempo en que la hembra inicia la oviposición del primer huevo hasta el último. Tiene una duración que varía de 4 a 60 días dependiendo del factor ambiente (radiación solar directa, temperatura, humedad relativa, depredadores, etc.), donde se pueden destruir los huevos, inhibirse la oviposición o la eclosión larvaria (Popham, 1991). Puede durar el doble en invierno en comparación con el verano. En laboratorio se observa un promedio de 20 días, con una media de 3000 huevos ovipositados por garrapata y rangos de 1400 a 5000 (Rosario-Cruz et al, 2007; Castellanos, 1993).

2.6.1.3. Post-oviposición o Metatoquia.

Esta fase comprende el tiempo entre la oviposición del último huevo y la muerte de la garrapata, la cual por lo general ocurre de 2 a 15 días después (Núñez, 1982).

2.6.1.4. Incubación

Esta fase inicia con la oviposición y finaliza con la eclosión larvaria (21 a 146 días). Durante este periodo, los factores ambientales como temperatura y humedad pueden influir directamente sobre la evolución del embrión (Castellanos, 1993; Núñez, 1982).

2.6.1.5. Eclosión

Es la etapa en que la larva emerge del huevo. Bajo condiciones naturales el porcentaje de eclosión es de aproximadamente 80% (Castellanos, 1993), sin embargo, en condiciones de laboratorio este porcentaje puede ser mayor.

2.6.1.6. Fase de encuentro

Después de que eclosionan las larvas (4 a 6 días), y ya que han adquirido la viabilidad necesaria para resistir los efectos del ambiente (Castellanos, 1993), suben a las plantas y llegan al extremo superior de las mismas, dónde se ubican preferentemente en gran número en la cara sombreada de las hojas. Se mueven conforme el día avanza con el fin de cubrirse de los rayos solares. Este geotropismo negativo es indicativo para considerar a la larva como infestante (Rosario-Cruz et al., 2007). En este momento la larva espera la llegada del hospedero, quien es detectado mediante quimiorreceptores, los que entre varias funciones pueden percibir el bióxido de carbono expelido por el vertebrado. Al percibir la presencia del posible hospedador, las larvas aumentan su actividad y adoptan una posición particular al sostenerse en sus dos patas posteriores y extender el par anterior para adherirse (Quiroz, 2005).

El amplio rango de la fase de vida libre se debe a la influencia de los factores ambientales, sobre todo temperatura y humedad, así, el ciclo puede acortarse a 20 días en condiciones muy favorables o prolongarse hasta 299 días en condiciones de frío extremo. Se ha informado de larvas que sobreviven hasta 286 días como larvas de vida libre sin alimentarse (Rosario-Cruz et al., 2007).

2.6.2. Fase de vida parasitaria

Esta fase inicia cuando la larva se sube y se fija a la piel del hospedero y termina cuando la teleógina se desprende del mismo para ovipositar, dura en promedio de 21 a 25 días (Solís, 1993). Los aspectos climáticos afectan poco el desarrollo de la garrapata adulta; sin embargo, las larvas necesitan superar algunas barreras asociadas con la resistencia del hospedero como son: el tipo de pelo (espesura, capilaridad), la densidad de glándulas sudoríparas y sebáceas, así como evitar el acicalamiento (Encinas et al., 1999). En el hospedero, la larva (de tres pares de patas) se alimenta de líquidos tisulares en las primeras 24 horas (Rosario-Cruz et al., 2007), posteriormente se repleta, y hay una disminución gradual de los movimientos de las extremidades hasta la total inmovilidad, en este momento se inicia la etapa quiescente o primera muda, denominada metalarva. Después se desarrolla una ninfa que se alimenta de sangre hasta repletarse, para posteriormente realizar una segunda muda denominada metaninfa y después dar origen a machos y hembras jóvenes (con cuatro pares de patas). Estas últimas emiten una o varias feromonas que atraen al macho para llevar a cabo el apareamiento, después la hembra se alimenta hasta repletarse para posteriormente desprenderse del hospedero e iniciar un nuevo ciclo. Los machos adultos se alimentan ocasionalmente, pero no se repletan de sangre. Estos recorren el cuerpo del hospedador por dos meses o más, mientras comen y se aparean para después volver a comer y buscar una nueva hembra para la reproducción, esto en forma sucesiva hasta su muerte (Rosario-Cruz et al., 2007). Debido a que no se repletan de sangre, los machos son relativamente pequeños.

2.7. Lesiones

Las lesiones principalmente se presentan en la piel donde se presenta pérdida de pelo, presencia de costras y en ocasiones abscesos. La acción hematófaga es considerable, llegando a ser mortal en infestaciones severas (Quiroz, 1989).

2.8. Signos

El ganado severamente infestado con garrapatas se encuentra en mal estado nutricional, tiene retardo en el crecimiento, anemia, debilidad, inapetencia y baja fertilidad (Quiroz, 1989). También pueden producir irritaciones e infecciones secundarias. En zonas endémicas de Babesiosis y Anaplasmosis se pueden presentar cuadros clínicos de estas enfermedades.

2.9. Diagnóstico

Si la carga parasitaria es alta, el diagnóstico se facilita, de otra manera es necesario inspeccionar cuidadosamente la piel de los animales en busca de fases inmaduras y adultos (Soulsby, 1987).

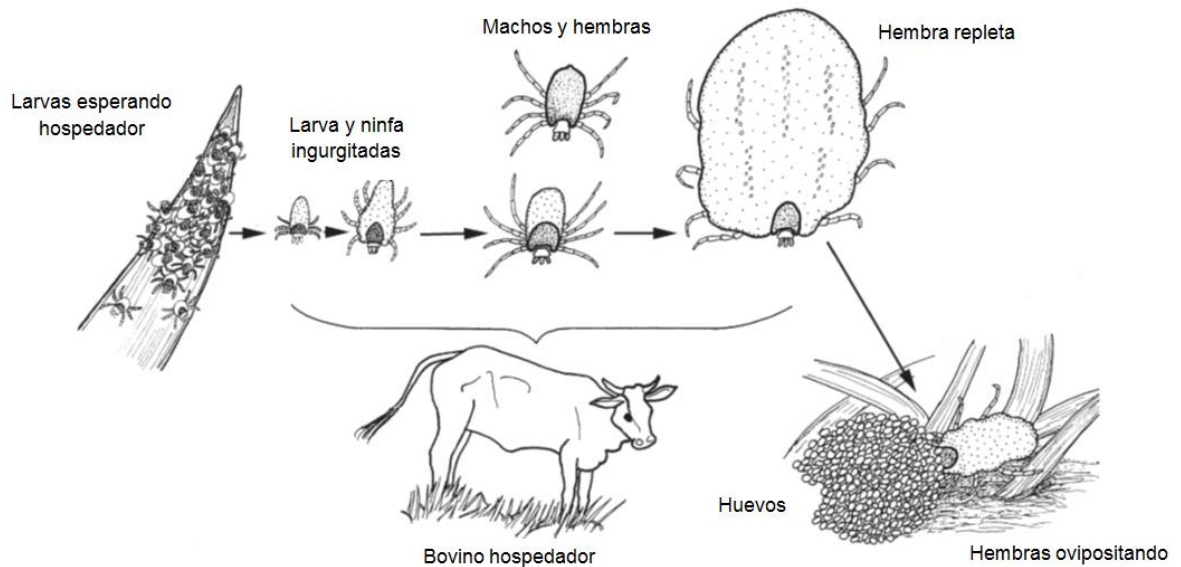


Figura 3. Ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus* (Modificado de Walker et al., 2003).

2.10. Dinámica poblacional de *Rhipicephalus microplus* en México

Rhipicephalus microplus se presenta con diferente intensidad a lo largo del año y, dependiendo de las condiciones climatológicas, su presencia varía entre las regiones ecológicas de México. Se ha reportado que las infestaciones por garrapatas se presentan durante todo el año en los estados de México con condiciones tropicales como Veracruz, Tabasco, Campeche y Yucatán (Alonso-Díaz et al., 2006, 2012; Rodríguez-Vivas et al., 2005). Se han reportado hasta cuatro generaciones de estas garrapatas por año, siendo los meses de Junio y Octubre los de mayor infestación. En los meses subsecuentes, las infestaciones por *R. microplus* disminuyen y se presenta un efecto de sustitución por la garrapata *A. cajennense* (Alonso-Díaz et al., 2012). En el cuadro 1 se presentan las variaciones de la presencia de las diferentes etapas de desarrollo de *R. microplus* y *Amblyomma cajennense* a lo largo del año.

Para optimizar el uso de productos químicos en el control de las garrapatas en las diversas regiones del país, es necesario conocer su dinámica poblacional. Se ha mencionado que la presencia de más de 20 garrapatas adultas repletas o semi-repletas por lado del animal rebasa el umbral económico (Soberanes-Céspedes y Ortiz-Estrada, 2014); por lo tanto, la aplicación de acaricidas puede realizarse cuando las infestaciones sean mayores a lo señalado. Sin embargo, tradicionalmente, en las unidades de producción bovina (UPB) el uso de productos químicos se ha implementado bajo una estrategia de erradicación y no de control, es decir, la mayoría de productores y/o profesionistas relacionados con la ganadería bovina no toleran la presencia de al menos una garrapata. En consecuencia, se aplican un gran número de baños/tratamientos al año lo cual acarrea problemas adicionales como el desarrollo de resistencia y la ruptura del equilibrio enzootico con otras enfermedades como babesiosis y anaplasmosis (Lozano, 2014).

Cuadro 1. Dinámica poblacional de *Rhipicephalus microplus* y *Amblyomma cajennense* a lo largo del año y entre estaciones (Tomado de Alonso-Díaz et al., 2013).

	PRIMAVERA			VERANO			OTOÑO			INVIERNO		
<i>Amblyomma</i>	Abundancia de pinolillos en potreros y animales			Marcada presencia de tostonas (ninfas)			Altas infestaciones por conchudas (adultas jóvenes)			Época de maduración de huevecillos en el suelo		
	Mejoran las condiciones ambientales			Después de las lluvias se presenta un nuevo brote en el número de garrapatas			Condiciones óptimas: se incrementan las garrapatas rápidamente			Condiciones adversas: disminuye el número de garrapatas en animales		
<i>Rhipicephalus</i>	Aumento paulatino de la cantidad de garrapatas									Pinolillos y huevecillos sobrevivientes esperan condiciones favorables para su desarrollo		
	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb

2.11. Principales zonas en el bovino donde se encuentra *R. microplus*

Rhipicephalus microplus tiene zonas preferidas en el cuerpo del bovino para fijarse a la piel y alimentarse. Estos lugares son generalmente los más frescos (llegan menos los rayos solares) y donde la piel es más delgada. Las zonas de fijación más frecuentes son: la región perineal (entre la ubre o testículos y el ano), testículos, área interna de las piernas y brazuelos, el vientre, en la base de la cola, el cuello y en la base o dentro de las orejas (García-Vázquez, 2010) (Figura 4). Esta información es de suma importancia debido a que al momento de realizar un baño garrapaticida mediante aspersión (que actualmente es el método más utilizado en campo), se debe de poner especial atención en que estas regiones queden perfectamente cubiertas con el producto.

De manera cotidiana, en el campo se comete el error de aplicar los productos acaricidas por aspersión en grupos de animales. Es decir, se aglomera

un número de animales en el corral de manejo y se asperja el producto solo en las zonas dorsales (Figura 5). Con esta forma de baño por aspersión es poco probable que el producto químico llegue a las zonas en que se encuentran las garrapatas (descritas previamente), lo cual puede ser un factor asociado al desarrollo de resistencia (Alonso-Díaz et al., 2012).

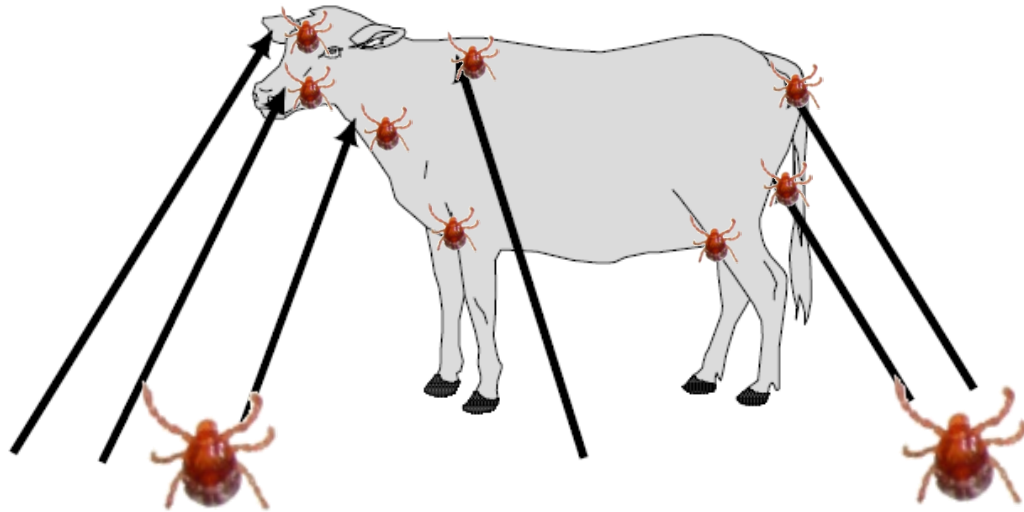


Figura 4. Principales zonas en el bovino donde se fija la garrapata *Rhipicephalus microplus* para alimentarse.



Figura 5. Baño por aspersión aplicando grupalmente el acaricida (mala práctica de aplicación).

2.12. Importancia económica de *Rhipicephalus microplus*

Por más de 100 años, las garrapatas y las enfermedades que transmiten han causado grandes pérdidas económicas a la ganadería bovina alrededor del mundo, especialmente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Estrada-Peña et al., 2006), donde tan solo *R. microplus* ha provocado pérdidas estimadas en 2.5 billones de dólares anuales (Lew-Tabor et al., 2014). Esta garrapata en bovinos causa pérdidas de sangre, reducen la producción de leche y carne, aumentan la mortalidad y aumenta los costos de producción asociados a tratamientos acaricidas frecuentes (García et al., 2011). Además, transmiten agentes patógenos como *Babesia spp* y *Anaplasma spp* (Rodríguez-Vivas et al., 2006), aumentan los gastos en los esquemas de manejo y tratamientos parasitarios y propician el desarrollo de poblaciones de garrapatas resistentes y multi-resistentes (Fernández-Salas et al., 2012a, b). Estas características negativas se traducen en altas pérdidas económicas para las UPB.

Por esta razón, esta garrapata se considera el principal ectoparásito a controlar en la ganadería bovina (Beverley, 1996). En México, se han estimado pérdidas anuales de 41 a 48 millones de dólares, de las cuales el 83.6 % han sido causadas en la producción de carne, 8.5 % en producción de leche, 6.3 % por mortalidad y 1.6 % debido al daño en pieles (Vega, 1991).

2.13. Métodos para el control de *Rhipicephalus microplus*

El control de *R. microplus* es fundamental en las explotaciones bovinas para mantener una ganadería exitosa, sobre todo en las zonas donde las garrapatas encuentran las condiciones ambientales favorables para su desarrollo.

En las regiones donde esta garrapata es endémica, los métodos de control incluyen el uso de acaricidas químicos, rotación de pasturas, modificaciones ambientales y estrategias de control biológico. El uso de razas resistentes es un

método de control importante en algunos países. Algunas vacunas son una realidad y otras están en prueba y son consideradas como métodos de control promisorios.

2.13.1. Control químico

Durante muchos años, el control químico ha sido la estrategia más utilizada para el control de las garrapatas en general. Los principales garrapaticidas utilizados pertenecen a las familias de los carbamatos, organoclorados, organofosforados, piretroides sintéticos, amidinas, inhibidores del desarrollo, lactonas macrocíclicas y las fenilpirazolonas (Rosario-Cruz et al., 2007). Los principales métodos de aplicación de estos químicos son: aspersión, inmersión, aplicación epicutánea (pour on) y métodos sistémicos (Alonso-Díaz et al., 2006).

2.13.2. Mecanismo de acción de los acaricidas químicos

Los acaricidas químicos actúan de diferente manera en el organismo de las garrapatas y, de acuerdo a su sitio de acción, son colocados en grupos específicos.

2.13.2.1. Inhibidores de la acetilcolinesterasa

Esta enzima termina la acción del neurotransmisor acetilcolina en la sinapsis nerviosa. Al inhibirla, causa hiper-excitación en el SNC, posteriormente parálisis y muerte (Hawkes et al., 2005; Liming et al., 2006). Ejemplo: Carbamatos y organofosforados. Estos son altamente tóxicos para los mamíferos (Díaz-Rivera, 2012).

2.13.2.2. Antagonistas del receptor GABA en el canal cloro

Bloquea el canal de cloruro activador de GABA y causa hiper-excitación y convulsiones. GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en los insectos. Ejemplo: Organoclorados (IRAC, 2016).

2.13.2.3. Moduladores del canal de sodio

Mantiene los canales de sodio abiertos, retrasando el mecanismo normal de inactivación del impulso nervioso con lo que se incrementa la liberación de neurotransmisores en las terminales nerviosas provocando principalmente ataxia, convulsiones, descoordinación y, finalmente, la caída de la garrapata (Hemingway et al., 2004, Peter et al., 2005). Los canales de sodio están envueltos en la propagación del potencial de acción a lo largo de los axones nerviosos. Ejemplo: Piretroides y piretrinas.

2.13.2.4. Agonistas del receptor de octopamina

Estos compuestos imitan la acción de la octopamina, así los receptores de octopamina se activan, lo cual conduce a una hiper-excitación, temblores, convulsiones, anorexia, desprendimientos e interrupción de la reproducción (Bloomquist, 2003; Chen et al., 2007). La octopamina en el insecto es equivalente a la adrenalina en los humanos; la neurohormona de lucha o huida. Ejemplo: formamidinas (IRAC, 2016).

2.13.2.5. Moduladores alostéricos de los canales de cloro ligados a los receptores glutamato (GluCl)

Alostéricamente se impide el cierre de los canales y se aumenta la permeabilidad de este ion, se hiperpolariza la membrana, cesa el estímulo nervioso y se origina una parálisis flácida con el consiguiente desprendimiento y muerte del parásito (Bloomquist, 2003). El glutamato es un importante neurotransmisor inhibitor en los insectos. Ejemplo: Avermectinas y milbemicinas (IRAC, 2016).

2.13.2.6. Inhibidores del crecimiento y desarrollo

Estos actúan imitando las hormonas de crecimiento de los ácaros, afectando directamente la formación de la cutícula y la biosíntesis de lípidos. Generalmente estos son de acción lenta (IRAC, 2016). Ejemplo: Diflubenzurón (Klein y Koch, 1977).

2.13.2.7. Inhibidores de la biosíntesis de quitina

Modo de acción definido incompletamente pero que lleva a la inhibición de la formación de la quitina. Ejemplo: Fluazuron (IRAC, 2016).

2.13.2.8. Efectores sobre los receptores del GABA

Actúan sobre los receptores del ácido gama-amino butírico (GABA). Poseen alta toxicidad en artrópodos. Bloquea los canales del cloro que son controlados por receptores del GABA. También bloquean dos tipos de activadores glutamato de los canales del cloro que se encuentran solamente en invertebrados. Provoca parálisis y posteriormente la muerte del artrópodo (Castro-Janer et al., 2010; Prullage et al., 2011). Ejemplo: Fipronil.

2.14. Resistencia de *Rhipicephalus microplus* a los acaricidas químicos

Entre los problemas más importantes a los que se ha enfrentado el combate químico contra las garrapatas *R. microplus*, está el desarrollo de la resistencia a los acaricidas (previamente mencionados), como ha ocurrido en casi todos los países en donde se han usado por largos períodos (Alonso-Díaz, 2006). Así, en la mayoría de los casos, los acaricidas propician alteraciones químicas o estructurales en las garrapatas que conducen, a través del fenómeno de selección genética, a una adaptación que les permite sobrevivir bajo las nuevas condiciones artificiales impuestas. Este fenómeno ha sido denominado en términos mundialmente aceptados como “resistencia” y se define como: “*la capacidad adquirida por una fracción poblacional de una especie parásita, la cual le permite sobrevivir a concentraciones de productos químicos que normalmente serían letales para la mayoría de los individuos de una población y esta capacidad es transmitida genéticamente a la siguiente generación*” (Woodham et al., 1983).

2.15. Mecanismos de resistencia química de *R. microplus*

Los mecanismos bioquímicos o genéticos mediante los cuales la garrapata *R. microplus* puede tolerar la aplicación de acaricidas químicos son la detoxificación metabólica, y la modificación del sitio de acción de las moléculas químicas; sin embargo, otras vías como la disminución de la absorción del acaricida y mecanismos conductuales en la garrapata también han sido mencionadas.

2.15.1. Detoxificación metabólica

La resistencia por detoxificación metabólica es causada por la actividad elevada de algunas enzimas como el citocromo P450, la glutatión-s-transferasas, oxidasas y las carboxilesterasas (Riddles et al., 1983; Miller 1998; Metcalf 1989; Liu y Scott, 1998). Estas enzimas tienen la capacidad de degradar y/o secuestrar a las moléculas de acción de los acaricidas, dependiendo del sistema enzimático o familia de químicos involucrados (Figura 6).

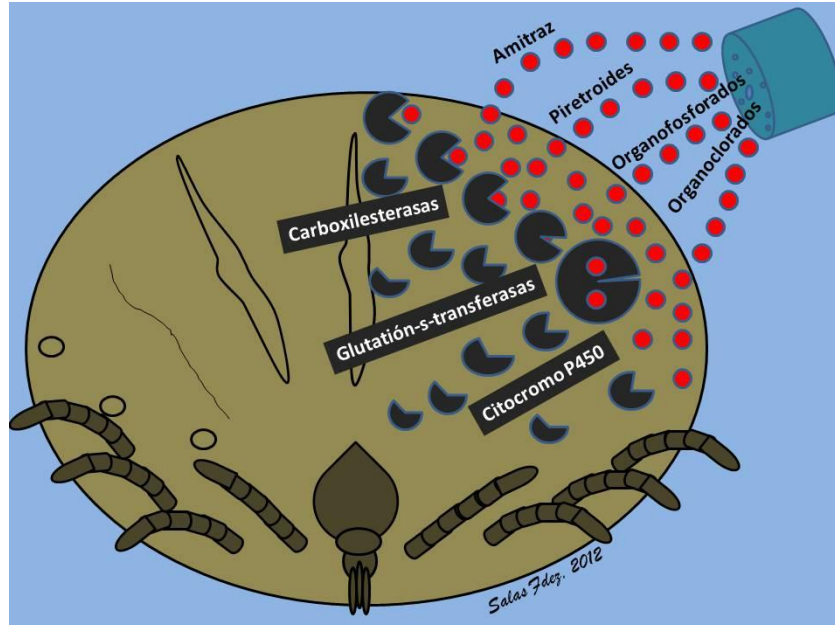


Figura 6. Resistencia a los acaricidas en garrapatas por detoxificación metabólica (secuestro de moléculas acaricidas).

2.15.2. Modificación del sitio de acción

Se ha mencionado que esta forma de resistencia es la principal causa de altos niveles de resistencia en las poblaciones de *R. microplus* (Alonso-Díaz et al., 2006). Este mecanismo se debe a la alteración del lugar donde las moléculas químicas actúan; es decir, no se completa la unión del químico con sus receptores dentro del organismo del parásito (Figura 7). Generalmente se provocan mutaciones en la secuencia de los genes que codifican para los receptores de acaricidas (canal de sodio por ejemplo) (Miller et al., 1999), puede existir una sustitución de aminoácidos en las regiones blanco donde el acaricida actúa (Guerrero et al., 2001; Rosario-Cruz et al., 2005), o las enzimas como la acetilcolinesterasa se ven alteradas desde una afectación en el gen que las codifica (Temeyer et al., 2007).

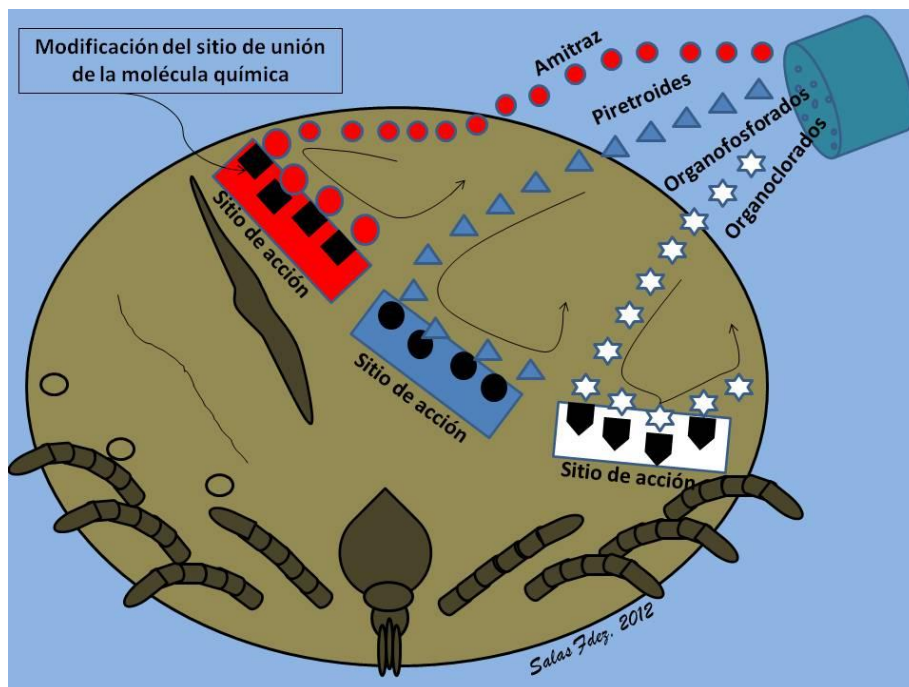


Figura 7. Resistencia a los acaricidas en garrapatas por modificación del sitio de acción.

2.15.3. Disminución de la absorción química

Este efecto se debe al desarrollo de barreras en la cutícula externa de *R. microplus* del tipo “modificación”. Así, la penetración de las moléculas químicas se ve inhibida o retardada. Los principales componentes de este efecto inhibitorio son los lípidos, los cuales se concentran en la cutícula impidiendo la absorción de los acaricidas químicos (Alonso-Díaz et al., 2006) (Figura 8).

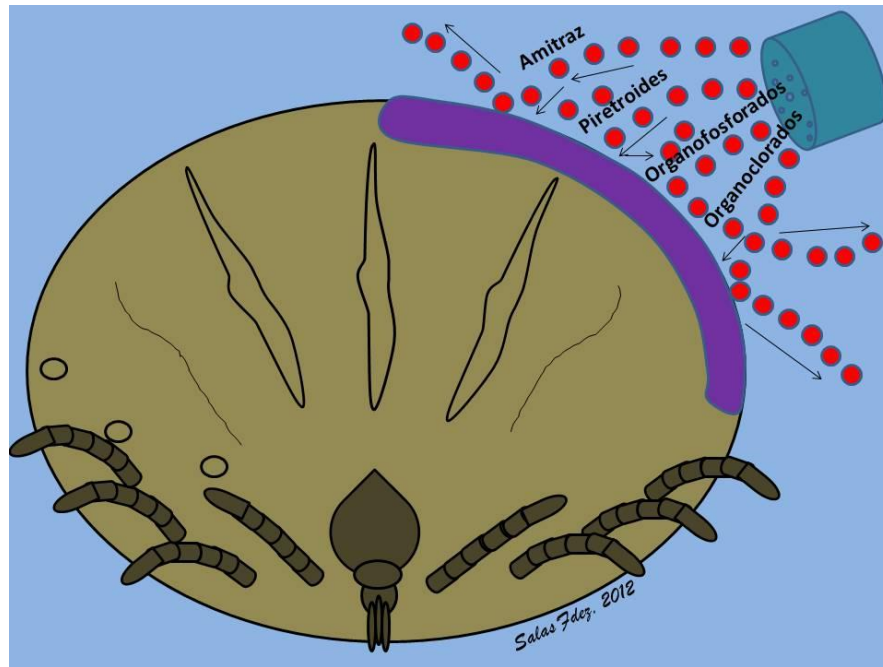


Figura 8. Resistencia a los acaricidas en garrapatas por disminución de la absorción de las moléculas químicas.

2.15.4. Resistencia por conducta

Las garrapatas tienen la capacidad de evadir el contacto con el químico, sobre todo en aquellas ocasiones donde no se aplica la cantidad adecuada del acaricida (Alonso-Díaz et al., 2006). Sin embargo, es el mecanismo que menos se ha reportado en las garrapatas.

2.16. Multi-resistencia

En diversos casos, las garrapatas *R. microplus* han manifestado su capacidad fisiológica de ser resistentes a diversos químicos usando la combinación de dos o más de los mecanismos mencionados. Esto hace más difícil

su control y resalta la importancia de la presencia de estas poblaciones en las UPB. La multi-resistencia se define como la capacidad de las poblaciones de garrapatas de utilizar diversos mecanismos de sobrevivencia con la finalidad de tolerar la aplicación de diferentes familias de acaricidas. Debido a que día a día las poblaciones multiresistentes de *R. microplus* están emergiendo, es importante el entendimiento de este fenómeno complejo (Benavides et al., 2000). Países como México, Uruguay y Australia han reportado este tipo de poblaciones (Fernández-Salas et al., 2012b; Benavides et al., 2000; Kearney, 2013).

2.17. Resistencia de *R. microplus* en México

En México, se ha reportado resistencia de *R. microplus* a casi todas las familias de acaricidas disponibles para su control. La resistencia a organofosforados (detectada por primera vez en Veracruz en 1983) (Aguirre y Santamaría, 1983) está bien registrada en el centro, sur y sureste del país (Rodríguez-Vivas et al., 2012). En el caso de la resistencia a piretroides (reportada su presencia en 1993), la dispersión prácticamente está en todas las zonas ganaderas de México (Fragoso et al., 1995; Santamaría et al., 1999). La resistencia a formamidinas (reportada por primera vez en 2002) (Soberanes et al., 2002) y su diseminación ha sido bien documentada en estados del sur, sureste y centro de México (Rodríguez-Vivas et al., 2006; Fernández-Salas et al., 2012a).

2.18. Resistencia de *R. microplus* en Veracruz

En el estado de Veracruz, 100% de los productores de bovinos de doble propósito (leche y carne) utilizan productos químicos más de 12 veces al año para controlar las garrapatas (Fernández-Salas, 2012a). Esta forma de control se ha vuelto cada vez menos eficiente debido a la aparición de garrapatas resistentes a estos productos. La resistencia de *R. microplus* a los acaricidas es un problema real en la ganadería bovina de Veracruz: de 53 poblaciones de garrapatas *R. microplus* monitoreadas, 90.6 % fueron resistentes a los piretroides, 54.7 % a las amidinas y 59.2 % a las lactonas macrocíclicas (Fernández-Salas, 2012a y c). De

las mismas poblaciones, 47.2 % mostraron un comportamiento doble resistente (Am y PS) y 39.1 % triple resistente (Fernández-Salas et al., 2012a). También se encontró la primera cepa multi-resistente a los ixodicidas (OF, PS y Am) y a las LM (Fernández-Salas et al., 2012b). En otros municipios del estado la resistencia también ha sido bien documentada. En otro ejemplo se reporta 28.7 % de resistencia para amitraz y 23.4 % para cipermetrina en el municipio de Comapa y de 36.9 % y 31.9 % para amitraz y cipermetrina, respectivamente, en el municipio de Manlio Fabio Altamirano (Peniche-Cardena et al., 2012).

La identificación de estas cepas resistentes y multi-resistentes resalta la necesidad de diseñar mejores estrategias de control mediante productos químicos alternativos y/o la combinación en estrategias integrales con químicos y organismos biológicos.

2.19. Control no químico

2.19.1. Uso de razas resistentes

El *ganado Bos indicus* es más resistente a las garrapatas que el ganado *Bos taurus*. Esta resistencia del *Bos indicus* se debe tanto a sus características fenotípicas como a su capacidad de desarrollar una respuesta inmune más eficiente después de una primera infestación (Utech et al., 1978). El introducir sangre *Bos indicus* es una alternativa altamente efectiva, pero con la desventaja de que se requiere de un proceso lento de selección, la colaboración del ganadero y una evaluación productiva de los animales (FAO, 2003).

2.19.2. Manejo de praderas

Estas son prácticas relacionadas con el manejo de potreros e involucra actividades tales como: quema controlada, inundación, remoción de maleza y subsuelo, descanso y rotación de potreros, así como modificación o manipulación del hábitat. Estas actividades disminuyen el desarrollo de las garrapatas por afectación del micro y el mesoclima, y por ende, un efecto negativo en su dinámica poblacional (Rosario-Cruz et al., 2007). El mayor efecto ocurre sobre la fase de

vida libre, y su valor radica en que es un método de lucha limpio y ecológico si se realiza de forma adecuada (Barre, 1988).

2.19.3. Vacunas

La inmunidad adquirida artificialmente es una alternativa en el control de la infestación por garrapatas en los animales domésticos, especialmente en el ganado bovino, la cual ha recibido particular atención en los últimos tiempos debido a las ventajas que su uso puede ofrecer (Cruz, 1995).

Se han desarrollado vacunas experimentales, ya sea por medio de la inoculación de extractos de glándulas salivales, antígenos salivales o antígenos de tipo oculto, que son antígenos de órganos internos de la garrapata como el antígeno Bm86, a partir del cual se han originado algunas proteínas recombinantes (Rosario-Cruz et al., 2007).

La vacuna daña el intestino del parásito, y produce problemas de sobrevivencia y la muerte. El efecto de la vacuna no es inmediato, se refleja después de tres meses de la vacunación. Es decir, su acción se ejerce sobre las siguientes generaciones y, paulatinamente, va disminuyendo la carga parasitaria en los potreros debido a una reducción en el potencial reproductivo de la garrapata. (Anónimo, 1997). Se han desarrollado dos vacunas comerciales (Tick Gard® y Gavac®) para el control de *Rhipicephalus* spp. (Fragoso, 1999), aunque han presentado problemas en el control de poblaciones de diferentes latitudes y problemas de producción.

2.19.4. Control biológico

El control biológico se desprende de un fenómeno natural que consiste en la regulación de plantas y animales por enemigos naturales que atacan sus diversos estadios de vida (Parra et al., 2002). Dentro de estos enemigos naturales existen microorganismos diversos como insectos, virus, bacterias, nematodos,

protozoarios, micoplasmas, ácaros y hongos, entre otros (Ojeda-Chi et al., 2011). De los organismos más promisorios para el control de garrapatas, y específicamente de *R. microplus*, están los HE. *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, han demostrado un 95 % de efecto sobre huevos, 100 % sobre larvas, 80-95 % sobre ninfas y 78-80 % sobre adultos de *R. microplus* (Lezama, 1995; Kaaya, 2000).

2.19.5. Hongos entomopatógenos

Los HE son microorganismos saprofitos que tienen la capacidad de reproducirse asexualmente (Kurtti y Keyhani, 2008), de establecerse, de colonizar y de matar diversos insectos y ácaros durante su desarrollo biológico. De forma natural, los HE pueden eliminar o mantener las plagas en niveles que no ocasionan daños económicos a los cultivos donde habitan (Azevedo y Melo, 1998). Estos hongos se encuentran en diversos hábitats, logrando un buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol. Sin embargo, de acuerdo a su capacidad de tolerar diversos climas, estos hongos pueden estar adaptados a regiones con condiciones extremas. Desde su descubrimiento como causantes de enfermedad en insectos, los HE se consideran agentes biológicos con potencial para ser usados en el control de plagas, tanto agrícolas como pecuarias (Barreto et al., 2004). Existen más de 700 especies de hongos identificadas con la capacidad de colonizar insectos plaga, pero sólo 10% son utilizados y evaluados para su control (Samish et al., 2004). En general, todos los insectos, y en especial los causantes de daños a plantas y animales, son susceptibles a los efectos patológicos de HE, incluyendo las garrapatas y sus diferentes estadios, así como géneros, especies y subespecies (Fernandes y Bittencourt, 2008; Kaaya y Hassan, 2000; Gindin et al., 2002; Fernandes et al., 2004).

Los principales HE que se han evaluado para el control de garrapatas en el ganado bovino son: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria (Cordyceps) bassiana*, *Isaria (Paecilomyces) fumosoroseus*, *Isaria farinosa*, *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* y *Nomuraea rileyi* (López y Hans Börje, 2001).

2.19.5.1. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin

Es un hongo de la clase Ascomycetes (Hypocreales: Clavicipitaceae), que fue aislado por primera vez en 1879 del escarabajo *Anisoplia austriaca* Herbst por Metchnikoff (Ferron, 1978). Se ha aislado también de suelos, de sedimentos y de materia orgánica en descomposición (Zimmermann, 1993). Tiene un amplio espectro de infección sobre más de 200 especies de insectos y ácaros de diferentes órdenes, incluyendo una gran variedad de garrapatas (Ojeda-Chi et al., 2011). Para la mayoría de las cepas, la temperatura óptima para su desarrollo y otros procesos es de 25 - 30° C y la humedad relativa de 100 % (Ferron, 1978). Sin embargo, estas características termo y húmedo tolerantes (y otras particularidades fisiológicas) dependen estrechamente de los orígenes naturales de los aislamientos y de la capacidad de adaptación de los hongos entre una especie y otra (Newman y Carner, 1975; Zimmerman, 1982). Por ejemplo, se ha reportado que algunas cepas de *M. anisopliae* pueden soportar hasta 40° C a nivel de campo (Li y Feng, 2009) y una HR mínima de 53 % (Dantygny y Nanguy, 2009). Pero la información que existe sobre la termo-tolerancia de *M. anisopliae* es variable y controversial (Rangel et al., 2005; Fernandes et al., 2007). Se ha reportado que *M. anisopliae* pueden tolerar una temperatura máxima de 49 a 60° C (Fargues et al., 1992), pero su desarrollo se ve detenido. No obstante, se ha reportado que temperaturas superiores a 35 - 37° C pueden reducir el porcentaje de germinación de las conidias y el crecimiento micelial, los cuales son indispensable en la patogenicidad y virulencia de los hongos (Quedraogo et al., 1997). Otro reportes mencionan que estos hongos se afectan a temperaturas mayores a 32° C. Este hongo es uno de los principales candidatos para el control biológico de garrapatas (Samish et al., 2004, 2008) debido a las características siguientes: 1) gran potencial mico-acaricida sobre diversos estadios de las garrapatas, 2) efectos sub-letales que posee como la reducción de la muda de

exoesqueleto, de la alimentación e inhibición de la oviposición y la eclosión (Kirkland et al., 2004), y 3) alta especificidad sobre insectos plaga.

2.19.5.2. *Cordyceps Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

Este hongo pertenece a la clase Ascomycetes (Hypocreales: Clavicipitaceae) y se considera un patógeno agresivo para una gran cantidad de insectos en sus diferentes etapas de desarrollo (Liu et al., 2002; Poprawski and Jones, 2000). Fue descubierto por Agostino Bassi en 1835 como patógeno de los gusanos de seda (Steinhaus, 1956). Es una especie cosmopolita que también se ha aislado de restos de plantas, suelos, insectos, alimentos e incluso del aire ambiental (Hajek, 1997; Shimazu et al., 2002). Se han reportado alrededor de 700 especies de insectos susceptibles (de Faria and Wraight, 2007) y su efectividad contra diferentes especies de insectos plaga es ampliamente conocida. Esta cualidad importante se ha atribuido a diferentes propiedades patógenas como la producción de una amplia variedad de componentes tóxicos (péptidos cíclicos) que afectan una extensa diversidad de insectos (Bidochka y Khachatourians, 1991; Vey et al., 2002), incluyendo garrapatas (Kaaya y Hassan, 2000). *Beauveria bassiana* tiene la capacidad de desarrollarse en rangos de temperatura desde los 15° C a 30° C y HR de 90 % (Baeteman, 1997). Sin embargo, la temperatura óptima de desarrollo para la mayoría de las cepas es de 25 - 30° C y 90 -100 % de HR (Godoy et al., 2007). Posee características positivas muy interesantes que sustentan su extenso uso a diversos niveles, tales como: amplio rango de insectos y ácaros plaga, alta patogenicidad hacia pestes, fácil y económica producción, rápido crecimiento, abundante esporulación y poca o nula efectividad sobre células de mamíferos y plantas (Feng et al., 1994). *Cordyceps bassiana* ha sido reportado como el estado sexual de *Beauveria bassiana* (Li et al., 2001).

2.19.5.3. *Isaria (Paecilomyces) sp.* (Holmsk.) A.H.S. Br. & G. Sm

Estos hongos Ascomycetes (Hypocreales: Clavicipitaceae) comprenden un numeroso conjunto de HE que se han aislado principalmente del suelo y del aire

(Aguilar et al., 1998). Dentro de estos, *P. fumosoroseus*, ha mostrado buena eficacia para el control biológico de insectos de 25 familias que incluye 41 especies (Smith, 1993) así como varios géneros de garrapatas (Gindin et al., 2001) incluyendo *R. microplus* (Angelo et al., 2012). La temperatura óptima de crecimiento de *P. fumosoroseus* es de 25 - 28° C, mientras que la de la esporulación es de 24° C (Hall et al., 1995; Marshall, 1995; Carr-Pérez et al., 2003). De acuerdo a cada cepa, sus límites de desarrollo pueden ubicarse entre 15 y 30° C. Es importante mencionar que este hongo no crece ni se desarrolla a temperaturas superiores a 32° C (Ortíz-Catón et al., 2011). Bien establecido presenta las mismas características positivas que se han mencionado previamente en los demás géneros de hongos.

2.19.5.4. *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* (Zimmerman) Viegas

Los HE del género *Lecanicillium* (especie *lecanii* y *psalliotae*, principalmente), Ascomycetes (Hypocreales: Clavicipitaceae), son un método de control de adultas, huevos y larvas de garrapatas *R. microplus* en condiciones de laboratorio (Angelo et al., 2010; Pirali-Kheirabadi et al., 2007; Gindin et al., 2001). La mayoría de las cepas de *L. lecanii* se desarrollan de manera óptima entre 23 y 25° C y cesan su desarrollo a menos de 11° C y a partir de 32° C (Ortíz-Catón et al., 2011; Osborne y Landa, 1992). Sus requerimientos adecuados de humedad para germinar, producir micelio y esporular van desde 92.5 % a 100 % (Hall, 1993).

2.19.5.5. *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson

De la clase Ascomycetes (Hypocreales: Clavicipitaceae), estos hongos patógenos de insectos son causantes de afectaciones en plagas agrícolas y han sido probados como bio-reguladores de artrópodos (Sujii et al., 2002a). Al menos 32 especies de insectos han sido reportadas como susceptibles a este hongo (Alves, 1998; Sosa et al., 2003). Recientemente, *Nomuraea rileyi* fue desafiado contra diferentes etapas de la garrapata *R. microplus*, y aunque mostró cierta

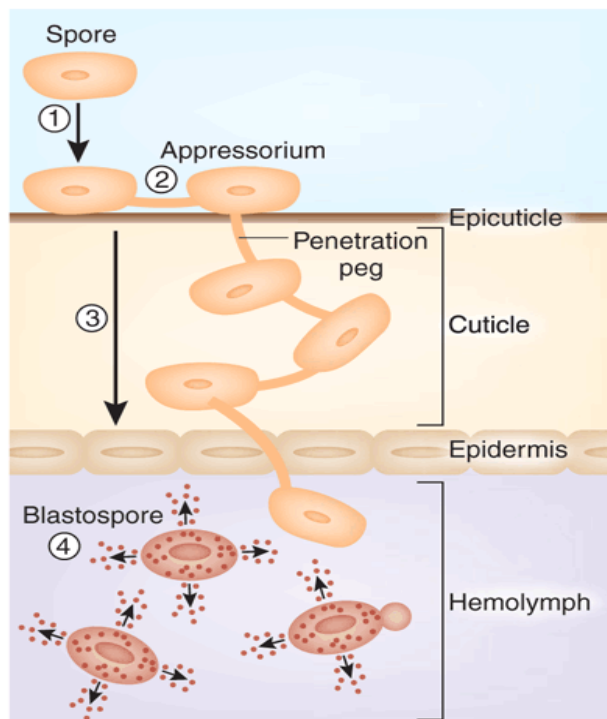
virulencia, no demostró ser un agente de control biológico importante para este ectoparásito en condiciones *in vitro* (Perinotto et al., 2012). Los rangos óptimos de desarrollo para este hongo varían de 20 - 30° C (Devi, 2000), aunque se ha mencionado que este entomopatógeno puede desarrollar mejor su efecto patógeno a temperaturas abajo de 20° C (Tang y Hou, 2001; Céspedes et al., 2008).

Uno de los principales puntos que se han mencionado en las generalidades de estos HE son la temperatura y la humedad óptimas de desarrollo y expresión de algunas características patogénicas contra insectos. Las necesidades de T y HR para cada género de hongo son diferentes, pero puede haber alta variabilidad de estos requerimientos dentro de un mismo género y especie de hongos, lo cual puede estar altamente influenciado por las características ambientales del nicho ecológico de origen de cada aislamiento. Lo anterior puede significar una alteración de su virulencia contra garrapatas en zonas climáticas diferentes de donde fueron aisladas originalmente.

2.20. Mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos

La infección de los HE sobre los insectos es similar, aunque pueden existir comportamientos infectivos atribuidos a cada género; sobre todo, en cuanto a las toxinas, enzimas producidas y formación de estructuras apresoriales, que pueden variar de acuerdo al género y cepa de hongo. La dinámica de infección de los hongos sobre organismos insectiles o ácaros se divide en seis etapas que son la adhesión de las esporas a la cutícula, germinación, penetración, invasión o colonización, muerte y emergencia (Arruda et al., 2005) (Figura 9). La infección inicia con el contacto de las esporas fúngicas a la cutícula (Jeffer et al., 1999). El tiempo de inicio de la germinación de esporas es de 12 a 24 horas para la mayoría de los hongos, e influyen factores como el género y la cepa de hongos, además de las condiciones de T y HR (Hall, 1993; Pendland y Boucias, 1997). Después de la germinación, se forman los tubos germinativos que buscan puntos de penetración (Shah y Pell, 2003). Algunas cepas desarrollan células apresoriales (apresorio) o

bien sustancias mucosas para fijarse a la cutícula del hospedero y facilitar la penetración de la cutícula. En esta etapa se producen enzimas que se utilizan para la degradación de la cutícula (Ferron et al., 1991). La infección continúa con la penetración (mecánica y/o enzimática) de la cutícula del insecto, de las partes bucales y/o de las membranas intersegmentales hasta alcanzar al hemocele. Después de colonizar la hemolinfa, el hongo se desarrolla (blastosporas) y se disemina (Gillespie y Claydon, 1989). Posteriormente se presentan los síntomas fisiopatológicos en los insectos o garrapatas, los cuales varían de acuerdo a la virulencia del hongo (parálisis, afecta excreción y/o alimentación) y, finalmente, el hospedador muere (Cañedo y Ames, 2004). La muerte es el resultado de una combinación de efectos mecánicos, afectaciones enzimáticas en la nutrición (degradación de azúcares y proteínas en hemolinfa), y efecto de toxinas sobre la movilidad y excreción. Las hifas emergen y ocurre la esporulación sobre el cadáver (Lee et al., 2005). Los HE no causan mortalidad instantánea en las garrapatas, sino que producen efectos sub-letales y letales en corto plazo sobre diferentes etapas de su ciclo de vida y su rapidez varía con cada cepa infectante de acuerdo a su patogenicidad y virulencia (Hornbostel et al., 2004).



En general, los hongos son capaces de infectar diversos estadios de desarrollo de *R. microplus* sin causar efectos colaterales en los animales de sangre caliente, ni al medio ambiente (Ojeda-Chi et al., 2011). Se han conducido estudios que demuestran que estos hongos sólo causan toxicidad en células de insectos y no en células de mamíferos, bacterias o

protozoarios (Skropek et al., 2005).

Figura 9. Modo de acción general de los HE: desde la adherencia hasta la colonización (Thomas y Read, 2007).

2.21. Evaluación de hongos entomopatógenos contra *R. microplus*

Durante las últimas décadas, se han conducido estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar HE como agentes bio-reguladores de las garrapatas (Fernandes y Bittencourt, 2008; Gindin et al., 2002; Ojeda-Chi et al., 2010). También se han realizado estudios para identificar y medir el efecto de las condiciones ambientales (T, HR y radiación UV), sobre su virulencia y patogenicidad (Rangel et al., 2004). Se puede resumir que cuando los hongos son evaluados *in vitro* (con condiciones ambientales y estatus fisiológico del hospedador controladas), el efecto acaricida es mayor que cuando se evalúan bajo condiciones naturales; y los factores que más se han discutido y documentado como causantes de estas inconsistencias, son los ambientales (Dimbi et al., 2004). Existen estudios que han evaluado cepas de *M. anisopliae* (con buenos resultados en laboratorio), pero contra infestaciones naturales de *R. microplus* han mostrado una eficacia muy baja (Lemmon et al., 2008; Amaro et al., 2011).

Los estudios que comparan el efecto de la hora de aplicación del hongo (tarde o madrugada vs medio día), pueden ayudar a determinar el efecto de la radiación o de las condiciones ambientales sobre la disminución en la efectividad garrapaticida de estos agentes microbianos. También es necesario evaluar si otras características tales como las micro-ambientales de la superficie del bovino, las defensas de la garrapata o el manejo de cepas de hongos, son un factor importante en esta inconsistencia. Por otro lado, muchas de las evaluaciones en condiciones naturales contra garrapatas se han realizado con cepas de HE aislados originalmente de nichos ecológicos diferentes al tipo de ecosistemas y climatología donde son evaluados; o también se aislaron de insectos poco relacionados con las garrapatas (Alonso-Díaz et al., 2007; Amaro et al., 2011). Es necesario realizar estudios para conocer las condiciones adaptativas y evolutivas que presentan las cepas de HE nativas sobre su patogenicidad y virulencia contra

garrapatas. Algunos estudios sugieren que, en general, las cepas de ciertos hongos tienden a mostrar mejor eficacia de control sobre su organismo original de aislamiento o sobre especies cercanamente relacionadas (Feng et al., 1994). No solo las condiciones climatológicas pueden estar influyendo en las inconsistencias de mortalidad *in vitro* o *in vivo* de los HE contra garrapatas, sino que existen otros factores relacionados con los bovinos y/o con las garrapatas, que pueden influir para que el efecto acaricida *in vivo* sea inferior a los estudios *in vitro*.

2.22. Factores que afectan el efecto de los hongos entomopatógenos

2.22.1. Factores ambientales

Los HE y su actividad garrapaticida son sensibles al estrés causado por los factores ambientales como humedad relativa, temperatura y, principalmente, los rayos ultravioleta (Samish et al., 2004). Existen hongos que toleran más que otros las altas temperaturas y los rayos UV y esto está influenciado directamente por el lugar de procedencia mediante adaptabilidad evolutiva (Rangel et al., 2005; Fernandes et al., 2007). Por ejemplo, Bidochka et al. (2001) reportaron que las cepas de hongos procedentes de suelos agrícolas mostraron mayor tolerancia a la luz UV que aquellos provenientes de suelos forestales. Otros factores que pueden influir sobre la eficacia *in vivo* de los HE son las características del microambiente de donde son aislados, por ejemplo, el pH, textura de los suelos y la composición de los sustratos (Ojeda-Chi et al., 2011).

De esa forma, se ha observado que los HE pueden exhibir una excelente eficacia para controlar a *R. microplus* en estudios *in vitro* (Morales-palma, 2010; Ojeda-Chi et al., 2010), pero bajo condiciones de campo, los estudios que existen han reportado algunas inconsistencias para controlar garrapatas (Leemon et al., 2008; Amaro et al., 2011). Alonso-Díaz et al. (2007) al evaluar la cepa Ma34 de *M. anisopliae* mediante la aspersion de conidias a bovinos infestados naturalmente con *R. microplus*, reportaron un control del 80%; sin embargo, el tratamiento fue aplicado a las 7 p.m. sin radiación solar y con una temperatura ambiental de 28 - 32° C. Posteriormente, esta misma cepa aplicada a las 12 a.m. con luz solar y

temperaturas superiores a los 35° C, tuvo una disminución en su eficacia (Sánchez-Rivera, 2010).

2.22.2. Factores bióticos y abióticos del bovino

El éxito de las aplicaciones de HE sobre el cuerpo de los bovinos para el control de garrapatas, puede depender de las características bióticas y abióticas de la superficie del hospedero mamífero (Polar et al., 2008). La temperatura corporal (que puede ser muy elevada y variable) puede afectar o no, el desarrollo de los hongos (Piccione et al., 2009; Polar et al., 2005).

La piel constituye la primera barrera física y de protección del organismo contra microorganismos patógenos y no patógenos como virus, bacterias, parásitos y hongos. La variación en la eficacia del hongo *M. anisopliae* contra garrapatas se ha atribuido a las características químicas específicas de las secreciones de la piel de los vertebrados (Polar et al., 2008), tales como las sustancias aceitosas y sebo que producen las glándulas sebáceas (Mitchell, 2002). Al respecto, Ment et al. (2010) mencionan que las sustancias lipoides de las glándulas sebáceas pueden afectar el efecto anti-garrapatas de los hongos en el hospedero bovino.

El pelo es otro factor que puede jugar un papel importante en la distribución de las esporas. Un gran número de conidias asperjadas en la superficie de los bovinos infestados de garrapatas no entran en contacto directo con las garrapatas, sino que son atrapadas entre el pelaje (Polar et al., 2008). El ganado *Bos taurus* puede presentar mayores obstáculos para que los HE ejerzan mejor su actividad acaricida, ya que se conoce que el pelaje en este ganado es más denso y largo en comparación con el ganado *Bos indicus* (Keissi, 2014). Es probable que las garrapatas que caminen sobre el pelaje para seleccionar su zona de alimentación, se infecten con esporas atrapadas e infectarse (Ment et al., 2010). Es importante mencionar que la viabilidad infectiva de las esporas de los HE sobre el bovino puede ser solo de 12 horas, por lo cual, la infección por residualidad es baja.

2.22.3. Defensas fisicoquímicas de las garrapatas

Las características físicas, químicas y genotípicas de las poblaciones de garrapatas son factores que pueden influir sobre el nivel de susceptibilidad/tolerancia a los HE. Las infecciones por hongos desencadenan una serie de reacciones que están directamente ligadas a la edad y a la etapa de desarrollo. En condiciones naturales estos mecanismos pueden ser aún más importantes, ya que se ha reportado que garrapatas provenientes de infestaciones naturales son más resistentes a los HE que las garrapatas obtenidas de forma artificial (Fernandes et al., 2011).

La epicutícula es la primera y la principal barrera física que tienen las garrapatas para protegerse de los efectos del ambiente, agentes químicos y la acción de organismos microbianos (Cherry, 1969; Ment et al., 2010). En el caso de la infección por HE, ésta constituye la primera barrera de defensa y el sitio principal de la interacción garrapata-hongo. El establecimiento y la rápida germinación de las conidias sobre la cutícula de las garrapatas es uno de los principales factores que determinan la patogenicidad de los hongos (Hassan et al., 1989; Samuels et al., 1989); por lo tanto, la composición química de ésta cutícula afecta esos procesos infectivos (Lord y Howard, 2004). Otros factores de virulencia, como la germinación de las conidias o el desarrollo del apresorio, son afectados por los componentes químicos de la cutícula (Jarrold et al., 2007; Ibrahim et al., 1999; Wang y Leger, 2005; Ment et al., 2010) También se han reportado acciones fungistáticas contra *B. bassiana* (Kirkland et al., 2004a, b) y *M. anisopliae* (Ment et al., 2010) por efecto de la composición química.

2.22.4. Defensas inmunológicas.

Las garrapatas, al igual que todos los invertebrados, poseen mecanismos inmunológicos para defenderse de aquellos patógenos que logran evadir la barrera cuticular, y logran llegar hasta el hemocele, hemolinfa o los órganos del insecto (Da Silva et al., 2006). Estos mecanismos inmunológicos incluyen diversas respuestas humorales y celulares (Gottar et al., 2006). Uno de los principales

mecanismos de defensa humoral que los insectos utilizan para defenderse de los organismos patógenos, como los HE, son los péptidos antimicrobianos (Johns et al., 1998; Tzou et al., 2002). Éstos fueron reportados como mecanismo defensivo en el plasma y en hemocitos de la garrapata *R. microplus* (Fogaca et al., 2006). También se reportó una proteína de defensa denominada defensina, la cual se encontró en la hemolinfa de la garrapata *Dermacentor variabilis* como respuesta a infecciones por microorganismos patógenos (Johns et al., 1998). Los hemocitos, prohemocitos, plasmaticos, granulocitos, esferulocitos, oenocitoides y coagulocitos juegan un papel muy importante en la respuesta de defensa celular en garrapatas, donde son responsables de fagocitosis, encapsulamiento de agentes extraños y formación de nódulos (Da Silva et al., 2006; Marmaras et al., 1996).

2.22.5. Edad de las garrapatas

La edad es diferente al estado biológico (larva, ninfa o adulta), ya que las garrapatas pueden tener diferentes edades al momento de infectar a los bovinos aunque se encuentren en la misma etapa biológica (larva por ejemplo). Las edades pueden ser altamente variables en condiciones naturales de infestación y de permanencia en los potreros donde los animales pastan (Alonso-Díaz et al., 2013). En algunos otros invertebrados, se ha mencionado que la edad influye en la rapidez con la que los HE los afectan, donde los más viejos mueren más rápido en comparación con los jóvenes (Mnyone et al., 2011; Ferron, 1967; Mohamed et al., 1977). Lo anterior ocurre porque los insectos viejos tienen una disminución de algunas enzimas de función inmunológica en la hemolinfa (Chun et al., 1995), de hemocitos circulantes inmunocompetentes (Li et al., 1992), disminución de la función de glándulas salivales, y cambios en la composición de la cutícula (Beckett, 1990; Chen et al., 1990). Además, de que las condiciones nutricionales a más edad se ven también afectadas, tal es el caso del glicógeno y las proteínas solubles totales, los cuales se deterioran con la edad (Mourya et al., 1993).

2.22.6. Estado nutricional de las garrapatas

El estado nutricional de las garrapatas es un factor que influye sobre el grado de susceptibilidad / resistencia que poseen contra los HE. Los organismos sin alimentarse de sangre son más susceptibles a la infección por HE, en comparación a los ingurgitados (Mnyone et al., 2011). También se ha reportado que las garrapatas con menos reservas de nutrientes (larvas o semi-ingurgitadas) son más susceptibles que las bien alimentadas. Otros estudios que han utilizado garrapatas ingurgitadas como modelo, mencionan que existe una mayor resistencia a las infecciones fúngicas cuando éstas están bien alimentadas (Samish et al., 2002; Arguedas et al., 2008).

2.22.7. Estado biológico

La variabilidad en la susceptibilidad entre las etapas de desarrollo de las garrapatas a los HE ha sido demostrada (Reis et al., 2001; Samish et al., 2002); sin embargo, se desconocen los mecanismos que existen detrás de esta variación.

2.22.8. Origen de las garrapatas

El origen de las poblaciones de garrapatas puede provocar una alta variabilidad en los efectos de los HE (Fernandes et al., 2011; Perinotto et al., 2012). Se ha reportado que incluso distancias cortas entre poblaciones de garrapatas, pueden ser factor de diferenciación en el proceso de afectación para los HE (Fernandes et al., 2011). Aún cuando está bien reportado este comportamiento en la literatura, las causas o mecanismos involucrados para el suceso de este fenómeno continúan sin conocerse.

III. JUSTIFICACIÓN

La garrapata *R. microplus* es una de las amenazas sanitarias más importantes en las regiones ganaderas del mundo, y el control biológico usando HE se presenta como una alternativa prometedora para su control. Además, la presencia de poblaciones resistentes de esta garrapata a los acaricidas químicos utilizados para su control es cada vez más evidente.

Las investigaciones encaminadas al aislamiento de HE de suelos de UPB para evaluar su efecto como control biológico de *R. microplus* son muy escasas. La mayoría de éstas se ha basado en cepas de HE aisladas de suelos de uso diferente a la ganadería, organismos no relacionados taxonómicamente con garrapatas y/o de regiones con características climatológicas diferentes a donde se van a usar; condiciones que pueden influir en una disminución de la eficacia garrapaticida de estos hongos en condiciones naturales. Por esta razón, es necesario identificar cepas de HE con potencial garrapaticida, pero que estén adaptadas a las condiciones ambientales de las principales zonas ganaderas del país, para que se puedan usar como método de control de *R. microplus*.

Además, cuando los HE son aislados con el objetivo de ser usados como control biológico, es importante realizar una identificación precisa. Usualmente la identificación se realiza analizando las características morfológicas y culturales de los hongos; sin embargo, esta forma podría no ser suficiente para una completa diferenciación. Diversos autores han mencionado que los hábitats pueden albergar diferentes especies de hongos y diferentes grupos genéticos dentro de esas mismas especies, por tanto, es necesario el uso de otros métodos más confiables y sensibles como las técnicas moleculares.

IV. HIPÓTESIS

En suelos del trópico mexicano utilizados para la producción de bovinos en pastoreo existen hongos entomopatógenos que presentan una elevada variabilidad genética, alta incidencia y con el potencial de reducir las poblaciones de garrapatas *Rhipicephalus microplus* resistentes o susceptibles a los acaricidas químicos.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

- 1) Obtener cepas de hongos entomopatógenos de suelos de unidades de producción bovina de zonas tropicales para ser utilizadas en el control de la garrapata *Rhipicephalus microplus* en infestaciones naturales.

5.2. Objetivos específicos

- 1) Aislar hongos entomopatógenos de suelos de unidades de producción bovina en el trópico de Veracruz, México.
- 2) Evaluar el efecto acaricida *in vitro* de los hongos entomopatógenos sobre garrapatas adultas de *R. microplus* y su reproducción en dos poblaciones, resistentes y susceptibles a los acaricidas químicos.
- 3) Evaluar el efecto acaricida *in vitro* de los hongos entomopatógenos sobre larvas de *R. microplus* de dos poblaciones, resistentes y susceptibles a los acaricidas químicos.
- 4) Determinar las características físicas, químicas y de manejo de los suelos usados para el aislamiento y evaluar su efecto en la presencia o ausencia de los HE.
- 5) Determinar la CL 50%, CL99% y efecto dosis-dependiente de los hongos sobre *R. microplus*.
- 6) Identificar y caracterizar los hongos aislados de suelos de UPB mediante técnicas morfo-taxonómicas y moleculares.
- 7) Analizar la relación filogenética entre las cepas de HE aisladas de los suelos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Área de estudio

El muestreo de suelos se realizó en doce municipios de la zona centro - norte del estado de Veracruz caracterizados por su alta actividad ganadera y elevada presencia de garrapatas, principalmente *R. microplus* y *A. cajennense* (Fernández-Salas et al., 2012b). En cada uno de estos municipios, seis UPB fueron elegidas por conveniencia, de acuerdo a las características de inclusión siguientes: 1) que la distancia entre cada rancho fuera igual o mayor a 20 km, 2) que tuvieran problemas por altas infestaciones de garrapatas y, 3) que hubiera el consentimiento del dueño para realizar los muestreos. Los municipios seleccionados, su localización y las características geo-climáticas de las zonas de muestreo se presentan en el cuadro 2 y la figura 10.

Cuadro 2. Características geo-climáticas promedio de los 12 municipios considerados para los muestreos de suelos en ranchos bovinos de Veracruz, México.

Mpio	Zona	Coord. (Lat y long)	Msnm	Clima	TP	PP	Tipo de suelo	Principal actividad
Atzacan		19°47'N.9 7°14'O.	1,660	Templado- húmedo- regular	16.2°C	2245.5 mm	Andosol Feosem Luvisol	Ganadería Agricultura
Misantla	Montañosa	19°56'N. 96°51'O.	300	Cálido- húmedo- regular	22.7°C	2036.4 mm	Luvisol Vertisol	Agricultura Ganadería
Yecuatla		19°52'N. 96°47'O.	420	Cálido- regular	22.5°C	1764.1 mm	Andosol	Agricultura Ganadería

Juchique de Ferrer		19°50'N. 96°42'O.	280	Cálido-regular	25°C	999.8 mm	Luvisol	Ganadería Agricultura
Martínez de la Torre		20°04'N. 97°04'O.	151	Cálido-húmedo-regular	23.7°C	1293.6 mm	Luvisol	Agricultura Ganadería
Colipa		19°55'N. 96°43'O.	200	Cálido-regular	22.4°C	1671 mm	Luvisol	Agricultura Ganadería
San Rafael	Planicie	20°11'N. 96°51'O.	30	Trópico-húmedo	30°C	1330 mm	Luvisol - Coluvial	Agricultura Ganadería
Tlapacoyan		19°58'N. 97°13'O.	430	Cálido-húmedo-regular	18°C	1500 mm	Luvisol	Agricultura Ganadería
Nautla		20°12'N. 96°46'O.	10	Cálido-húmedo	22.5°C	1338 mm	Gleysol Aluvial Coluvial.	Ganadería Agricultura
Vega de Alatorre		20°02'N. 96°57'O.	10	Cálido-regular.	23.9°C	1368.7 mm	Coluvial	Ganadería Agricultura
Tecolutla	Costera y montañosa	20°29'N. 97°00'O.	10	Cálido-regular.	23.6°C	1494.0 mm	Regesol	Ganadería Agricultura
Alto Lucero		19°45'N. 96°49'O.	2040	Templado-regular.	25.2°C	1105.6 mm	Feosem	Ganadería Agricultura

Mpio: municipio; Coord: coordenadas; Lat: latitud; Long: longitud; Msnm: metros sobre el nivel del mar; TP: temperatura promedio; PP: precipitación pluvial; N: Norte; O: Oeste; mm: milímetros. Información obtenida de INEGI. Carta topográfica, 2013 y Gobierno del Estado de Veracruz, anuario estadístico, 2012.

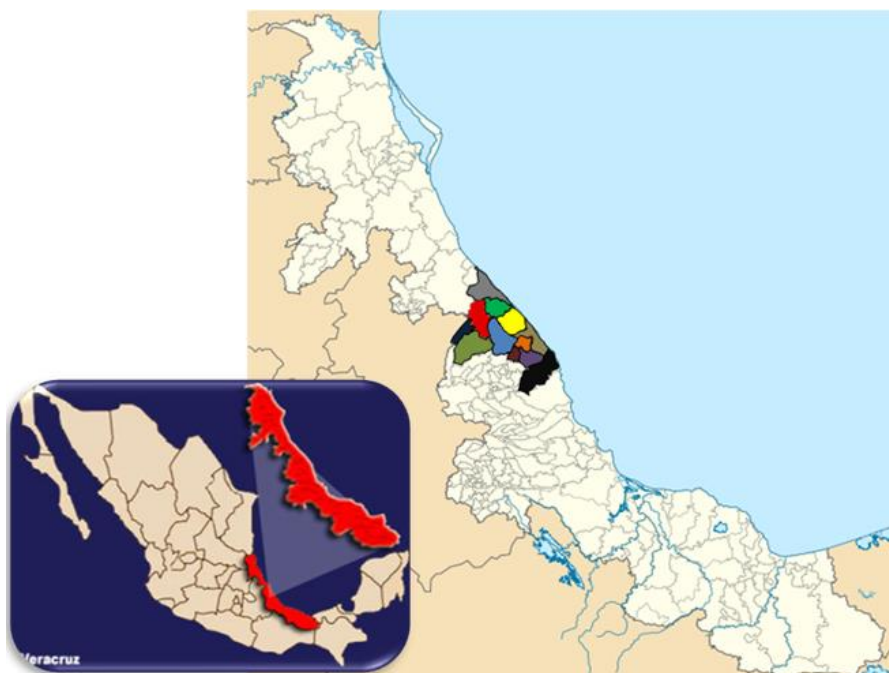


Figura 10. Representación esquemática de la situación geográfica del Estado de Veracruz en México y los municipios de muestreo se suelos.

Durante el estudio se visitaron un total de 125 UPB, de las cuales 72 cumplieron con los criterios de inclusión establecidos para el estudio. El nombre de las UPB, municipio y sus características de presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3. Nombre, municipio, altitud y localización GPS de las UPB para el muestreo de suelos en busca de hongos entomopatógenos.

Nombre UPB	Municipio	Altitud (msnm)	Latitud
Topilito	Alto Lucero	616	19°44'32.0136"N - 96°32'44.3328"W
El Colorado	Alto Lucero	437	19°47'0.5928"N - 96°29'16.6848"W
Las Torres	Alto Lucero	174	19°51'30.9168"N - 96°30'43.2216"W
Sta. Sofía	Alto Lucero	11	19°45'55.4328"N - 96°25'17.3496"W
Brazo Fuerte	Alto Lucero	125	19°45'05.61"N - 96°29'54.90"W
El Desafío	Alto Lucero	19	19°42'54.70"N - 96°25'23.92"W
La Soledad	Atzalan	113.7	20°02'46.56"N - 97°4'38.361"W

Del Rincón	Atzalan	157.0	20°01'55.02"N - 97°08'20.1617"W
San Pedro	Atzalan	160	20°00'15.952"N - 97°06'12.959"W
EL Pimiento	Atzalan	188	19°59'34.823"N - 97°06'8.614"W
El Cerro	Atzalan	572	19°56'52.512"N - 97°01'59.508"W
Plan Arroyos 2	Atzalan	750	19°53'23.087"N - 97°05'55.134"W
Ejido viejo	Colipa	197.9	19°55'43.3992"N - 96°42'24.5988"W
La Defensa	Colipa	223.4	19°53'26.3616"N - 96°43'21.8856"W
Laurel	Colipa	211.1	19°57'28.6344"N - 96°43'6.8736"W
Los Pérez	Colipa	152.5	19°56'31.4268"N - 96°43'24.6000"W
San Julián	Colipa	308.1	19°52'26.5260"N - 96°42'42.5592"W
La Isleta	Colipa	196.1	19°54'59.7924"N - 96°43'16.9500"W
Corralitos	Juchique de Ferrer	601.6	19°49'31.5948"N - 96°39'45.2124"W
El Puente	Juchique de Ferrer	312.1	19°50'38.184"N - 96°41'12.0912"W
El Palmar	Juchique de Ferrer	636.0	19°48'43.0380"N - 96°40'56.1252"W
Loma Alta	Juchique de Ferrer	719.8	19°48'27.9108"N - 96°40'38.2440"W
La Técnica	Juchique de Ferrer	370.8	19°50'23.2800"N - 96°41'50.4708"W
San Patricio	Juchique de Ferrer	377	19°50'25.8252"N - 96°41'39.5340"W
Acosta	Misantla	633.1	20°1'19.9524"N - 96°55'37.9020"W
Sn Felipe	Misantla	618.1	20°0'59.6088"N - 96°55'38.4204"W
La Valle	Misantla	236.3	20°0'10.8036"N - 96°53'47.2812"W
Carreón	Misantla	435.5	20°0'40.7196"N - 96°54'48.9564"W
Pueblo Viejo	Misantla	727.2	19°50'11.7384"N - 96°52'11.4852"W
Trapiches	Misantla	540	19°50'27.3120"N - 96°52'24.4308"W
La Unión	Martínez de la Torre	67.1	20°9'0.7560"N - 97°0'3.9060"W
Arenal	Martínez de la Torre	100.8	20°13'3.648"N - 97°0'41.7492"W
Ma. de la Torre	Martínez de la Torre	39.9	20°7'26.047"N - 96°59'37.6"W

La Zanja	Martínez de la Torre	66.0	20°15'1.4400"N - 96°59'30.5376"W
Zanjas Arena	Martínez de la Torre	70	20°10'51.297"N – 97°02'22.682"W
Ixtacuaco	Martínez de la Torre	82	20°03'1.528"N – 97°08'20.025"W
El Ciruelo	Nautla	62	20°6'25.2756"N - 96°53'9.6612"W
Buenavista	Nautla	10.6	20°9'1.6848"N - 96°51'19.7964"W
El Raudal	Nautla	5.5	20° 9' 8.0928"N - 96°42'49.089"W
4 Caminos	Nautla	4.7	20°11'36.2522"N - 96°52'7.2183"W
La Aurora 1	Nautla	6.9	20°12'0.2124"N - 96°45'29.8476"W
Santa Rosa	Nautla	18.8	20°6'1.1124"N - 96°42'39.1068"W
Arroyo Zarco	San Rafael	44	20°09'50.099"N – 96°56'45.517"W
P. Aldama	San Rafael	10.9	20°10'50.700"N - 96°55'7.6476"W
BG	San Rafael	6	20°14'21.2964"N - 96°54'6.2676"W
San Valentín	San Rafael	5.1	20°14'5.9208"N - 96°47'42.8532"W
San Carlos	San Rafael	38	20°9'9.6876"N - 96°56'10.442"W
La Aurora 2	San Rafael	8.7	20°12'34.356"N - 96°53'14.6924"W
El Copalar	Tecolutla	8.9	20°16'35.1300"N - 96°49'16.4604"W
Los Mangos	Tecolutla	18.5	20°23'22.2936"N - 96°57'53.3880"W
El Abanico	Tecolutla	32.6	20°22'25.2480"N - 96°58'34.1076"W
Hueytepec	Tecolutla	42.6	20°19'21.5472"N - 97°1'27.5016"W
El Playón	Tecolutla	2	20°15'2.428"N – 96°48'23.64"W
Camino Viejo	Tecolutla	30	20°22'6.927"N – 96°59'25.884"W
La Garita	Tlapacoyan	142	19°58'46.0992"N - 97°12'7.2180"W
El Clarín	Tlapacoyan	110.9	20°2'6.1224"N - 97°6'9.6912"W
A. Piedra	Tlapacoyan	117.8	20°2'1.8276"N - 97°7'0.1488"W
La Ordeña	Tlapacoyan	135	20°1'28.8588"N - 97°8'25.0764"W
El Río	Tlapacoyan	374	19°59'3.491"N – 97°14'37.405"W

Plan Arroyos	Tlapacoyan	221	19°56'55.649"N – 97°06'8.035"W
El Laurel	Vega de Alatorre	6.4	20°7'27.1236"N - 96°41'20.688"W
Paso Chilares	Vega de Alatorre	50.2	19°59'57.3108"N - 96°40'10.9128"W
El Vado	Vega de Alatorre	4.1	20°2'59.9136"N - 96°38'25.8468"W
La Ceiba	Vega de Alatorre	23.8	20°3'4.2120"N - 96°42'11.5560"W
Boca Coyoles	Vega de Alatorre	16	19°58'37.646"N – 96°34'19.864"W
Las Iguanas	Vega de Alatorre	96	19°54'42.956"N – 96°35'5.286W
El Cuecha	Yecuatla	546.7	19°52'23.5236"N - 96°47'12.2784"W
Chanita	Yecuatla	288.9	19°53'57.732"N - 96°44'49.0308"W
2 Arroyos	Yecuatla	468.7	19°52'41.8476"N - 96°46'40.6236"W
Km. 11	Yecuatla	483.9	19°51'42.0912"N - 96°46'54.4368"W
La Loma	Yecuatla	1043.6	19°45'39.3408"N - 96°40'30.3312"W
Santa Rita	Yecuatla	558	19°50'54.854"N – 96°46'1.272"W

GPS: Posición geográfica satelital; UPB. Unidad de Producción Bovina; msnm: metros sobre nivel del mar; N: Norte; W: Oeste.

6.2. Muestreo de suelos

Las UPB se visitaron dentro del periodo Enero 2013 a Noviembre 2013. De cada uno de los 72 ranchos bovinos se tomaron tres muestras de suelos (216 muestras de suelos en total) de tres zonas homogéneas: a) potrero, se seleccionó un lugar donde los bovinos pastan la mayor parte del tiempo y donde la presencia de garrapatas (larvas, ninfas y adultas) tiende a ser muy elevada, b) cercos vivos, lugar donde los bovinos buscan sombra para descansar y refugiarse del sol y donde las condiciones de humedad son propicias para el mantenimiento de los hongos y el desarrollo de ectoparásitos y, c) corrales, el lugar donde los animales se reúnen para su manejo (ordeña, amamantamiento, alimentación y tratamientos zootécnicos), y donde las garrapatas pueden desprenderse y desarrollarse (Alonso-Díaz et al., 2013). De cada zona, se tomaron cinco sub-muestras de suelo de 400 g aproximadamente (INTA, 2000) (dos kilogramos total). El sistema de

muestreos en cada zona fue sistemático y se realizó de acuerdo a los siguientes protocolos. En potrero, el muestreo se realizó en forma de cinco de oros (SENASICA, 2012) a una distancia de 50 m entre cada punto. Dentro de cada UPB se seleccionó el potrero a muestrear de forma aleatoria y de acuerdo al número de potreros (ninguno de los potreros sobrepasó las 10 hectáreas de superficie) (Rendón, 1994). Los cercos vivos se eligieron por conveniencia, en donde se marcó un transecto y cada 25 metros se tomó una sub-muestra hasta cubrir 100 m (Jeroen-Huising, 2011). En los corrales, las sub-muestras se tomaron al azar en forma de zig-zag cada 30 pasos de distancia hasta completar las cinco (Buduba, 2004). Cada muestra de suelos se obtuvo con la ayuda de un muestreador de suelos tipo barreno (Lord 0225[®]) a una profundidad de 0 - 200 mm (INTA, 2000) y 30 mm de diámetro sin considerar la materia orgánica (Buduba, 2004). Las cinco sub-muestras de cada zona, se mezclaron para su homogenización, se colocaron en bolsas de polietileno limpias e identificadas con los datos de la UPB, y se colocaron en hieleras plásticas para su protección y transporte.

6.3. Datos del área de muestreo y manejo de suelos en las UPB

Con la finalidad de identificar posibles factores asociados a la presencia o ausencia de HE en las UPB, en cada sitio seleccionado para el muestreo de suelos, se recorrió el área considerando las zonas homogéneas en cuanto a tipo de suelo y apariencia física (Carrillo, 1995). Se registraron, acorde observación, los detalles de las áreas de muestreo dentro de la UPB como: partes altas o bajas, planas o inclinadas, coloración del suelo, si era arenoso o pesado y vegetación alta, media o baja. En los sitios se determinó por observación el tipo de vegetación, zona inundable o no inundable. Las coordenadas geográficas del sitio y la altitud de la zona de muestreo (msnm) se obtuvieron con la ayuda de un GPS (Explorist 500[®], Magellan).

A los dueños o encargados de las UPB se les aplicó un cuestionario para conocer las características historiales del manejo de suelos en los potreros, tales

como tiempo de uso pecuario, fertilización y frecuencia de aplicación de herbicidas. Las características de las UPB y su ordenamiento para su análisis se presentan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Características (variables) del manejo de suelos de las UPB consideradas como posibles factores asociados a la presencia de los hongos entomopatógenos en UPB de Veracruz, México.

Variables	Descripción	Término
		0-200
Altura	Altura en msnm de la zona de muestreo de suelos en la UPB.	201-400
		401-600
		>601
Uso de herbicidas	Utilización de químicos para el control de malezas.	Si
		No
Tiempo siendo UPB	Años que el suelo ha sido dedicado a la producción de bovinos.	10-20 años
		21-30 años
		>31 años
Región	Región dentro del Estado de Veracruz donde se aislaron los suelos en las UPB.	Costera Planicie Montañosa
Uso de fertilizantes	Aplicación de fertilizantes para pastos	Si
		No
Zona muestreada	Posición del muestreo dentro de la UPB	Zona alta
		Zona baja
Superficie de muestreo	Forma de la superficie muestreada	Plana
		Inclinada
Riesgo de inundación	Zonas que pueden presentar inundaciones en ciertas épocas del año.	Inundable
		No inundable

Consistencia del suelo	Presencia de humedad en la muestra de suelo	Pesado Arenoso
Densidad vegetal	Altura y cantidad de vegetación presente en la zona muestreada	Alta Media Baja
Tipo de vegetación	Tipo de vegetación presente en la zona	Arboles Pasto Maleza Nada
Tipo de suelos	Clasificación taxonómica del suelo de acuerdo al sistema de clasificación de la FAO.	Andosol Feosem Luvisol Vertisol Gleysol Coluvial Regesol

6.4. Transporte de las muestras de suelo

Las muestras de suelo colectadas e identificadas se colocaron en hieleras plásticas con refrigerantes para protegerlas de los rayos solares directos (Buduba, 2004). Posteriormente, se transportaron al Laboratorio de Sanidad Animal del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical FMVZ-UNAM en Martínez de la Torre, Veracruz, México, y procesadas inmediatamente o almacenadas a 4° C por un máximo de 30 días hasta su procesamiento.

6.5. Manejo de suelos en laboratorio y aislamiento de hongos

Las muestras de suelo se pasaron a través de un tamiz con poros de 2 mm de apertura con la finalidad de remover piedras así como restos de basura y de plantas (Navarro-García y Navarro-García, 2013). Cuando las muestras estaban muy secas, se les aplicó agua destilada estéril para proporcionarle humedad. Del suelo tamizado, se tomaron 300 gramos que fueron colocados en contenedores de 1 kg de capacidad.

Para el aislamiento de HE de los suelos colectados, se utilizó la técnica de sebo con larvas de la polilla mayor de la cera *Galleria mellonella* (Zimmermann, 1986). Este método se ha recomendado ampliamente para el aislamiento de HE, debido a que ha demostrado ser muy eficaz para este propósito. Posteriormente, a cada contenedor se le colocaron cinco larvas de *Galleria mellonella* de último estadio como cebo para los HE de los suelos. Cada muestra se identificó e incubó a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ de temperatura durante una semana (Hernández-Velázquez et al., 2011). Cada dos días los contenedores se invirtieron con la finalidad de que las larvas entraran en contacto con toda la muestra de suelo.

Pasados los siete días, se recuperaron las larvas de las muestras de suelo, se separaron y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.5 % durante tres minutos; posteriormente, fueron secadas con papel absorbente y enjuagadas con agua destilada estéril tres veces (Bacca, 2014). En seguida, las larvas se colocaron individualmente en cajas de Petri (60 x 10 mm) conteniendo papel filtro Whatman # 1 esterilizado y humedecido con agua destilada estéril. Las cajas de Petri con las larvas fueron identificadas e incubadas en una estufa de cultivo durante 10 días a $27 \pm 2^\circ \text{C}$ de T y 85-95 % de HR. Las larvas de *Galleria* se observaron diario para identificar señales de micosis, verificar condiciones de humedad y descartar infecciones por bacterias. Las larvas que mudaron a pupa en las muestras de suelos durante la incubación, se desecharon.

6.6. Identificación morfológica de los hongos aislados

Cuando se observó crecimiento de hongos en las larvas de *G. Mellonella*, y posteriormente la esporulación de éstos, se procedió a su identificación mediante

claves morfológicas (Domsch et al., 1980; Nelson et al., 1983; Samson et al., 1987). Las larvas infectadas con hongos oportunistas o fitopatógenos fueron desechadas (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp o *Fusarium* sp.). Después de su identificación, los hongos caracterizados como entomopatógenos, se sembraron en Agar Papa y Dextrosa más 0.1 g/L de estreptomycin y 0.5 g/L de oxitetraciclina. Los medios de cultivo se evaluaron cada 2 días, con la finalidad de evaluar el desarrollo de los hongos y para descartar aquellos contaminados. Después de 21 días del sembrado, por segunda vez, se procedió a identificar los hongos basados en las características morfológicas de las estructuras reproductivas, forma y tamaño de sus esporas y las características de crecimiento en el medio de cultivo (Samson et al., 1987).

A cada cepa se le asignó una clave de identificación que consistió en las iniciales del género y especie, la inicial del estado de aislamiento y un número consecutivo de acuerdo al orden de aislamiento (MaV01 a MaV59, BbV01 a BbV06, PfV01 a PfV02 y PIV01 [Ma = *Metarhizium anisopliae*; V = Veracruz; 01, 02, 03... 59 = de acuerdo a la secuencia de aislamiento]).

6.7. Análisis químico y físico de los suelos

Con la finalidad de determinar si la calidad nutricional de los suelos está relacionada con los aislamientos de HE, se utilizaron 1000 g de la muestra de suelo colectada para realizar la determinación y cuantificación química de los principales componentes nutricionales mediante la técnica de colorimetría (Ryan et al., 2001; Fernández-Linares et al., 2006). Los componentes químicos determinados fueron: nitrógeno, fosforo, potasio, calcio, magnesio, cobre, fierro, zinc y manganeso. Además se determinó el pH y la materia orgánica en la muestra. Debido a problemas con el financiamiento del proyecto, solo se procesaron 137 muestras de 210 colectadas.

Las muestras se extendieron sobre un papel limpio y seco en una capa delgada y se procedió al tratamiento de secado al aire y en una estufa de secado.

Se dejaron secar por 72 horas y posteriormente se molieron las muestras con un rodillo de madera y luego se pasaron por un tamiz de 2 mm de diámetro (Ryan et al., 2001). Posteriormente, se empacaron en bolsas plásticas estériles hasta su análisis.

Brevemente, la técnica consiste en poner la muestra de suelo en digestión en agua, se filtra y la determinación se hace sobre el filtrado. El método está fundamentado en la propiedad de determinadas sustancias solubles, llamadas “reveladores” o “indicadores”, de dar a un medio acuoso, coloraciones o tonalidades en relación con el valor de los que se está analizando (Mena et al., 2013). El pH se determinó mediante el uso de un potenciómetro 860 SCHOTT® Instruments, y la materia orgánica se determinó por reducción del dicromato de potasio por componentes de carbón orgánico y la determinación subsecuente del dicromato no reducido por oxido-reducción con sulfato de amonio ferroso (Ryan et al., 2001).

6.8. Reproducción y almacenamiento de los HE

Las esporas de los hongos aislados e identificados como entomopatógenos, con 21 días de edad, se resembraron en agar papa y dextrosa en placa con la finalidad de obtener cultivos monospóricos de cada HE. Después de 21 días post-siembra, y a partir de los cultivos monospóricos, se realizó una nueva identificación morfológica y se procedió a sembrar los HE en forma estriada en agar papa y dextrosa en tubo inclinado para su purificación/almacenamiento (Humber, 2012). Después de 21 días de crecimiento, las conidias se colectaron por raspado en agua destilada estéril con 15 % de glicerol y 1 ml fue colectado y depositado en criotubos estériles de 1.5 ml con 10 repeticiones (10 ml total) (Malik y Hoffmann, 1993). Los criotubos se almacenaron en un congelador a -80° C para su posterior uso.

6.9. Identificación molecular de los hongos entomopatógenos

Cada cepa de HE de la colección almacenada, se descongeló (un criotubo) y se sembraron 100 µl en agar papa y dextrosa (APD) en placa para posteriormente ser incubados en una estufa de cultivo a 28°C. El tiempo de incubación duró hasta que se observó desarrollo de micelio en el medio de cultivo.

6.9.1. Obtención del ADN de los hongos entomopatógenos

El ADN de los HE se obtuvo del micelio de acuerdo a la técnica descrita por Hoffman y Winston (1987) y Galán-Franco et al. (2011). Brevemente, las placas de APD con el HE sembrado fueron abiertas en una campana de extracción donde se colectó el micelio con la ayuda de una espátula y una asa bacteriológica estériles. Después, el micelio se transfirió a paquetes de papel aluminio estéril y, se congeló a -120° C durante una hora. Pasado el tiempo, los paquetes se retiraron de la congelación y se colocaron en nitrógeno líquido por 20 segundos para, en seguida, obtener el micelio y macerarlo en un mortero de porcelana estéril. Del micelio macerado, se tomaron 500 mg y se colocaron en tubos Eppendorff de 1.5 ml, al cual se le agregaron 600 µl de una solución Buffer-UREA (Urea 7 Molar; NaCl 0.35 Molar; TrisHCl 0.05 Molar, pH 8.0; EDTA 0.02 Molar y Sarcosina 1%). Los tubos con la solución se homogenizaron en un vortex durante dos minutos, y posteriormente se pusieron a reposar por 30 minutos a temperatura ambiente. Como siguiente paso, se agregaron 600 µl de fenol-cloroformo (1:1) a los tubos, se homogenizaron en el vortex durante cinco minutos y a continuación se centrifugaron a 10,000 rpm en una centrífuga refrigerada por 15 minutos a 4° C. Posteriormente, el sobrenadante fue recuperado y transferido a un tubo nuevo para agregarle 600 µl de fenol-cloroformo nuevamente. Se utilizó la misma metodología, arriba descrita, hasta obtener el sobrenadante. A continuación, cinco µl de ARNasa (Sigma, St. Louis, MO), diluidos en 150 µl de agua ultra-purificada, fueron adheridos al sobrenadante y la mezcla fue incubada a 37° C durante diez minutos. Después se agregaron 600 µl de fenol-cloroformo nuevamente y se siguió la misma metodología hasta obtener el sobrenadante. Éste se transfirió a un nuevo tubo donde se agregaron diez volúmenes de acetato de sodio (3 M) (1:10),

y dos volúmenes de Isopropanol (1:2), con la finalidad de precipitar los ácidos nucleicos, y en seguida se incubaron por una hora a -20° C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante diez minutos a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se recuperó el botón de ADN. El ADN se lavó con 1 ml de etanol al 70 % y se centrifugó por cinco minutos a 13,000 rpm. A continuación el ADN se resuspendió en 30 µl de agua estéril ultra purificada.

La concentración de ADN se cuantificó utilizando un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA), y se almacenó a 4° C hasta su requerimiento.

6.9.2. Amplificación del ADN de los hongos entomopatógenos

Para el análisis de identificación molecular a través del ADN de los HE, se amplificaron las secuencias de los espaciadores transcritos internos (ITS; por sus siglas en inglés) de genes ribosomales utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) mediante un termociclador Bio-Rad T 100 JB Lab. Para la amplificación se utilizaron los primers universales ITS1 (5` TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3`) e ITS4 (5` TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3`) (White et al., 1990), los cuales amplifican un fragmento de 550 pares de bases incluyendo: una secuencia parcial de la subunidad 18S, el ITS1, la subunidad 5.8S, el ITS2 y una secuencia parcial de la subunidad 28S del ADN ribosomal.

Las mezclas para las reacciones de PCR se separaron en tubos Ependorff de 0.2 mL en un volumen final de 12.5 µl. Cada reacción estaba compuesta por 0.25 µl de cada primer (Sigma-Aldrich®), 0.625 µl de MgCl₂, 0.2 µl de dNTPs (Invitrogen™), 0.15 µl de Taq polimerasa (Amplificasa®, BioTecnol, México), 1.25 µl de 10X de buffer de reacción PCR, 1 µl de ADN y 8.77 µl de agua destilada estéril.

Los ciclos térmicos se diseñaron de acuerdo al siguiente esquema: un ciclo inicial de desnaturalización de 94° C por cinco minutos, después 38 ciclos (desnaturalización: 94° C por 30 segundos; alineamiento: 56°C por 30 segundos; extensión: 72°C por un minuto) y un ciclo de extensión final a 72°C por cinco

minutos. Los productos PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1 % en 1X TAE. Un marcador de 100 pb (GelPilot®) fue utilizado y los geles se tiñeron con bromuro de etidio ($0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) y fueron visualizados en luz UV con la ayuda de un foto-documentador.

Todos los productos PCR fueron purificados con un Kit de purificación QIAquick (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. La región amplificada 5.8S de ADN se secuenció en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV, Irapuato, Guanajuato, México. El método de secuenciación fue el Sanger y la tecnología de capilares con sistemas AB13730 X1.

6.10. Efecto acaricida *in vitro* de los HE contra dos poblaciones de garrapatas adultas de *R. microplus*

La metodología y las técnicas utilizadas para la evaluación de los HE contra las adultas se presenta en los artículos científicos anexados en el presente escrito.

6.11. Efecto acaricida *in vitro* de los HE contra larvas de *R. microplus*

6.11.1. Obtención de las larvas de *R. microplus*

Del total de teleóginas colectadas en las infestaciones artificiales, 300 de cada población (resistente o susceptible) fueron seleccionadas para incubarlas a $27 \pm 1.5 \text{ }^\circ\text{C}$ y 85 - 86 % HR, para obtener su masa de huevos (Cen et al., 1998). A los 12 días post-incubación, los huevos se retiraron y se colocaron en viales de cristal e incubados a las mismas condiciones de T y HR durante 20 días, con la finalidad de obtener la progenie larval de *R. microplus*. Se utilizaron larvas de 7 - 14 días de edad en los bioensayos (Rodríguez –Vivas et al., 2006).

6.11.2. Efecto de HE sobre la mortalidad de larvas de *R. microplus*

Para esta evaluación, se utilizaron las mismas 55 cepas de *Metarhizium* y seis de *Beauveria*, para desafiarlas contra larvas de *R. microplus*. Los HE se obtuvieron con la misma metodología descrita en la sección 6.10.2. La viabilidad de las esporas se determinó colocando 100 µl de la suspensión con las conidias en medio ADP, se incubaron a las mismas condiciones descritas previamente y se contabilizaron las colonias 24 - 48 h post-incubación (Alves, 1998). La viabilidad de las esporas excedió el 96 %.

Aproximadamente 100 larvas fueron adheridas a cinta adhesiva y posteriormente sumergidas en una suspensión de 1×10^8 conidias/ml durante 1 minuto. Otro grupo con la misma cantidad de larvas fue inmerso solo en agua destilada adicionada con 0.1 % de Tween80 (grupo control). Las larvas en la cinta adhesiva, se transfirieron a una caja de Petri con papel filtro Whatman # 1 humedecido con agua destilada estéril. Se sellaron las cajas de Petri y se incubaron a 27 ± 1.5 °C y 85 - 86 % HR en oscuridad (Cen et al., 1998). Las garrapatas se examinaron cada dos días durante 20 días post-tratamiento, con la finalidad de detectar algún signo de infección fúngica y registrar la mortalidad. Se realizaron tres repeticiones de cada cepa de HE y del grupo control. La mortalidad en el grupo control no debió exceder el 5%. Las garrapatas se consideraron muertas si había ausencia de movimiento después de la estimulación o por observación de micelio emergiendo de la cutícula.

6.14. Análisis estadístico

La frecuencia de aislamientos de HE de los diferentes municipios, UPB y zonas dentro de cada UPB se analizaron con estadística descriptiva con el programa Excel® (Office®2010). El efecto de los factores de manejo de suelos sobre la presencia y/o ausencia de HE se analizó mediante un análisis de regresión logística con el software Statgraphics®.

Las secuencias obtenidas del ADN de los HE fueron editadas y ensambladas utilizando el programa BioEdit (Hall, 1999). Los alineamientos múltiples de las secuencias se realizaron con el programa Clustal W (Thompson et

al., 1994). Se hizo un análisis de Máxima Parsimonia y un árbol filogenético de las secuencias de los HE mediante el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) 5.0 (Tamura et al., 2011) usando el algoritmo del vecino cercano (close-neighbor-interchange). La robustez de las ramas se estimó mediante un análisis bootstraps con 1000 muestreos repetidos de los datos analizados (Felsenstein, 1985). Las secuencias fueron alineadas usando el programa Blast del GenBank con el objetivo de determinar los porcentajes de homología con especies previamente reportadas y, así, confirmar su identidad.

El efecto del tratamiento con HE sobre la mortalidad de adultas y sobre la inhibición de la eclosión de las larvas se analizó mediante una prueba de Kruskal-Wallis (SAS, 1991). Para cada teleógina, se calculó el índice de la eficiencia reproductiva (IER = peso de la masa de huevos/peso inicial de la hembra ingurgitada; [Rodríguez-Vivas and Cob-Galera, 2005]).

Se utilizó ANOVA de un factor del programa Minitab® para determinar las diferencias estadísticas de susceptibilidad a los HE entre las poblaciones de garrapatas resistentes o susceptibles, el IER y para determinar el efecto del pH, materia orgánica y los componentes químicos nutricionales del suelo sobre la ausencia/presencia de HE en las UPB.

El cálculo de las CL₅₀ y CL₉₉ se realizó mediante un análisis probit con el software LeOra®. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado significativo.

El efecto del tratamiento de HE sobre la mortalidad de larvas de *R. microplus* se analizó mediante una prueba de U Mann Whitney usando el software Statgraphics.

VII. RESULTADOS

7.1. Hongos entomopatógenos aislados de los suelos de las UPB

Se aislaron 59 cepas de *Metarhizium anisopliae*, 6 cepas de *Beauveria bassiana*, 2 cepas de *Paecilomyces (Isaria) sp.* y una de *Purpureocillium lilacinum*. Del total de cepas aisladas, se perdieron por contaminación seis de *Metarhizium* y una de *Beauveria*.

También se aislaron hongos patógeno-oportunistas de los géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Mucor*, mismos que se desecharon después de su identificación.

Metarhizium anisopliae fue el HE más común en los suelos de UPB del Estado de Veracruz (Figura 1). Dentro de cada UPB, el corral de manejo fue el lugar donde se aisló la mayor cantidad de estas cepas (24 / 55; 40.7 %), seguido del potrero (19 / 55; 32.2 %) y del cerco vivo (16 / 55; 27.1 %). Para *B. bassiana*, el lugar donde más cepas se aislaron fueron los cercos vivos (3 / 6; 50 %). Las únicas dos cepas de *Isaria (Paecilomyces sp.)*, y *P. lilacinum* también se aislaron de los cercos vivos (Figura 11). De esta forma, la mayor riqueza de géneros de HE se encontró en los cercos vivos, donde se presentaron los cuatro géneros encontrados (Figura 11).

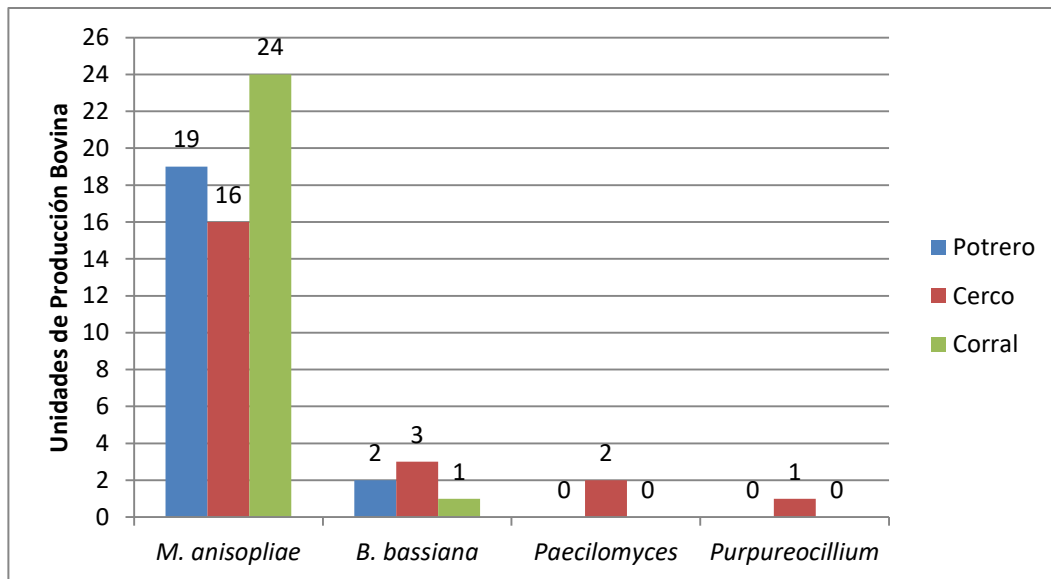


Figura 11. Distribución de hongos entomopatógenos dentro de las UPB por zona de muestreo.

La distribución del aislamiento de HE por municipio y en las UPB se presentan en el cuadro 5. La mayor abundancia y riqueza de HE se encontró en la región plano-montañosa (Yecuatla, Juchique de Ferrer, Colipa) y en menor proporción en la zona costera (Figura 12; Cuadro 5). En el municipio de Martínez de la Torre no se encontraron HE en las UPB (Figura 12).

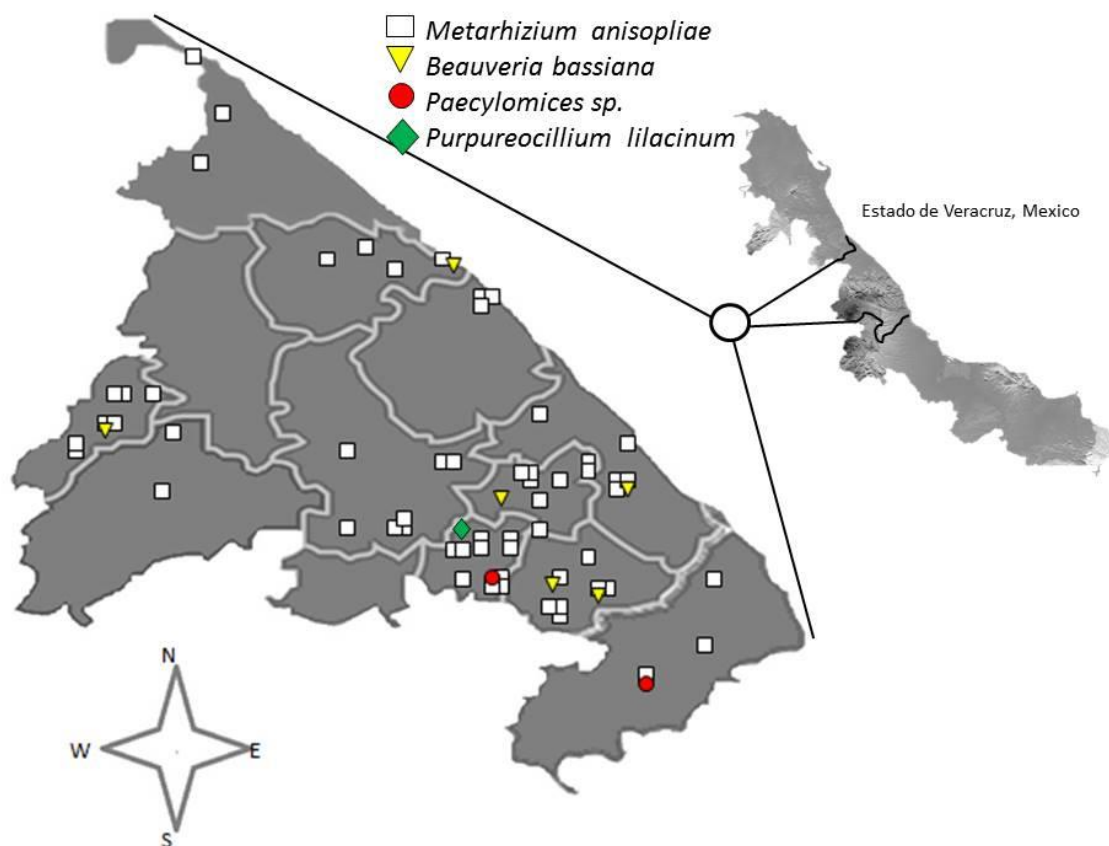


Figura 12. Distribución de hongos entomopatógenos en UPB en 12 municipios de la zona centro-norte de Veracruz, México.

Cuadro 5. Municipio y Unidad de Producción Bovina en donde se aisló cada cepa de HE.

Cepa aislada	Municipio de Aislamiento	UPB	Cepa aislada	Municipio de Aislamiento	UPB
MaV01	Tlapacoyan	Arroyo de Piedra	MaV26	Colipa	La Defensa
MaV02	Tlapacoyan	Ordeña	MaV28	Colipa	Ejido Viejo
MaV03	Tlapacoyan	La Garita	MaV34	Colipa	Isleta
MaV04	Tlapacoyan	Arroyo de Piedra	MaV37	Colipa	Los Pérez
MaV05	Tlapacoyan	La Garita	MaV39	Colipa	San Julián
MaV06	Tlapacoyan	La Ordeña	MaV42	Colipa	Los Pérez

MaV08	Tlapacoyan	El Clarín	MaV51	Colipa	Los Pérez
BbV01	Tlapacoyan	La Ordeña	MaV58	Colipa	San Julián
			BbV06	Colipa	El Laurel
MaV07	Atzalan	La Soledad			
MaV36	Atzalan	Del Rincón	MaV27	Yecuatla	La Loma
			MaV29	Yecuatla	Dos Arroyos
MaV09	Misantla	Acosta	MaV32	Yecuatla	El Cuecha
MaV13	Misantla	Carreón	MaV33	Yecuatla	El Cuecha
MaV14	Misantla	Carreón	MaV43	Yecuatla	Km. 11
MaV17	Misantla	Pueblo Viejo	MaV48	Yecuatla	Chanita
MaV18	Misantla	Trapiches	MaV53	Yecuatla	Chanita
MaV19	Misantla	Trapiches	MaV54	Yecuatla	Dos Arroyos
MaV20	Misantla	Trapiches	MaV56	Yecuatla	La Loma
			MaV59	Yecuatla	La Loma
MaV10	Alto Lucero	Topilito	PfV02	Yecuatla	La Loma
MaV11	Alto Lucero	El Colorado			
MaV12	Alto Lucero	Las Torres	MaV30	Vega de Alatorre	Paso Chilares
PfV01	Alto Lucero	Topilito	MaV35	Vega de Alatorre	La Ceiba
			MaV40	Vega de Alatorre	Paso Chilares
MaV15	San Rafael	Puntilla Aldama	MaV44	Vega de Alatorre	Paso Chilares
MaV16	San Rafael	BG	MaV45	Vega de Alatorre	El Vado
MaV23	San Rafael	San Valentín	BbV03	Vega de Alatorre	Paso Chilares
MaV24	San Rafael	Aurora 2			
BbV02	San Rafael	San Valentín	MaV38	Juchique de Ferrer	Loma Alta
			MaV41	Juchique de Ferrer	Loma Alta
MaV21	Tecolutla	Los Mangos	MaV46	Juchique de Ferrer	El Palmar

MaV22	Tecolutla	El Abanico	MaV47	Juchique de Ferrer	El Puente
MaV55	Tecolutla	Hueytepec	MaV49	Juchique de Ferrer	Loma Alta
			MaV52	Juchique de Ferrer	El Palmar
MaV25	Nautla	Aurora 1	MaV57	Juchique de Ferrer	La Técnica
MaV31	Nautla	Aurora 1	BbV04	Juchique de Ferrer	La Técnica
MaV50	Nautla	Aurora 1	BbV05	Juchique de Ferrer	El Palmar

7.2. Análisis químico de los suelos de las UPB

El análisis de los suelos (Cuadro 6) demostró que el pH de los suelos dedicados al pastoreo es, en su mayoría, de neutro a alcalino (98 [71.5 %]) y solo 39 (28.5 %) suelos presentaron pH ácido (Figura 13). En la mayoría de los suelos (121 / 137; 88.3 %), el porcentaje de materia orgánica fue de medio a alto (1.43 % a 4.36 %). Solo 16 muestras de suelos (11.7 %) tuvieron porcentajes bajos de materia orgánica (Figura 14).

Cuadro 6. Componentes químicos de las muestras de suelos obtenidas de las UPB de Veracruz, México.

Municipio	Rancho	Zona	N	P	K	Ca	Mg	Cu	Fe	Z	Mn
			mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg ⁻¹	mg/kg ⁻¹	mg/kg ⁻¹	mg/kg ⁻¹
Nautla	Raudal	Cerco	17.54 (B)	13.63 (B)	109.82 (B)	546.88 (B)	266.52 (M)	2.25 (B)	43.0 (A)	3.20 (A)	14.03 (M)
Tlapacoyan	A. Piedra	Cerco	23.66 (M)	25.78 (M)	282.41 (M)	3291.07 (A)	335.71 (A)	2.65 (B)	22.5 (M)	1.4 (B)	19.0 (M)
Colipa	El Laurel	Potrero	18.6 (B)	16.04 (B)	247.41 (M)	4000.0 (A)	332.59 (A)	3.10 (B)	10.5 (B)	1.35 (B)	29.6 (A)
Misantla	Trapiches	Corral	14.79 (B)	13.48 (B)	286.16 (M)	3873.21 (A)	410.27 (A)	3.13 (B)	11.70 (B)	1.3 (B)	32.5 (A)
Tlapacoyan	El Clarín	Potrero	9.98 (B)	12.61 (B)	215.18 (M)	2196.88 (M)	192.41 (B)	5.75 (A)	17.10 (M)	1.60 (B)	16.5 (M)
Misantla	Trapiches	Potrero	28.51 (M)	16.37 (B)	294.40 (M)	3856.72 (A)	327.60 (M)	6.71 (A)	8.60 (B)	1.08 (B)	24.35 (M)
Misantla	Carreón	Potrero	16.78 (B)	9.55 (B)	230.36 (M)	3667.41 (A)	473.21 (A)	3.80 (B)	11.20 (B)	1.35 (B)	31.70 (A)
Tlapacoyan	La ordeña	Cerco	10.66 (B)	14.06 (B)	188.39 (M)	3760.71 (A)	503.57 (A)	4.16 (A)	14.20 (B)	1.50 (B)	27.10 (A)
Misantla	Carreón	Corral	12.67 (B)	13.29 (B)	178.92 (M)	3478.11 (A)	382.56 (A)	3.45 (B)	11.32 (B)	1.48 (B)	31.27 (A)
Misantla	P. viejo	Potrero	16.66 (B)	12.59 (B)	172.41 (M)	3919.64 (A)	487.95 (A)	3.50 (B)	4.60 (B)	1.60 (B)	36.40 (A)
Misantla	Acosta	Corral	16.35 (B)	11.88 (B)	93.30 (B)	3600.00 (A)	319.20 (M)	6.93 (A)	9.30 (B)	1.40 (B)	24.20 (M)
Nautla	El Ciruelo	Potrero	14.60 (B)	7.34 (B)	285.00 (M)	3339.00 (A)	318.00 (M)	1.08 (B)	8.00 (B)	1.53 (B)	34.80 (A)
Tlapacoyan	La Ordeña	Corral	19.42 (B)	17.85 (B)	107.94 (B)	3853.00 (A)	423.55 (A)	3.18 (B)	21.52 (M)	1.62 (B)	29.70 (A)
Misantla	Acosta	Cerco	19.15 (B)	16.23 (B)	93.56 (B)	3542.86 (A)	326.30 (M)	3.12 (B)	18.45 (M)	1.47 (B)	28.40 (A)
San Rafael	BG	Corral	17.89 (B)	14.11 (B)	85.36 (B)	3993.30 (A)	420.09 (A)	3.15 (B)	14.80 (B)	1.45 (B)	31.50 (A)
Nautla	La Aurora	Cerco	13.50 (B)	14.61 (B)	324.00 (A)	3956.00 (A)	337.00 (A)	1.04 (B)	13.00 (B)	1.40 (B)	27.80 (A)
Atzalan	La Soledad	Cerco	12.62 (B)	15.35 (B)	98.45 (B)	3719.64 (A)	439.73 (A)	2.50 (B)	6.35 (B)	1.31 (B)	29.00 (A)
San Rafael	San Carlos	Corral	18.88 (B)	10.17 (B)	97.66 (B)	3839.73 (A)	391.96 (A)	4.15 (A)	6.00 (B)	1.50 (B)	33.80 (A)
Nautla	El Ciruelo	Corral	19.54 (B)	22.71 (M)	281.30 (M)	3749.22 (A)	379.44 (A)	5.31 (A)	20.40 (M)	1.06 (B)	27.53 (A)
Misantla	Trapiches	Cerco	22.51 (M)	19.07 (B)	101.14 (B)	3799.04 (A)	348.22 (A)	6.25 (A)	23.65 (M)	1.18 (B)	22.93 (M)
Tecolutla	Mangos	Potrero	8.60 (B)	9.40 (B)	394.00 (A)	3483.00 (A)	374.00 (A)	1.84 (B)	17.00 (M)	0.75 (B)	34.80 (A)
San Rafael	Sn Valentín	Potrero	8.40 (B)	9.12 (B)	348.00 (A)	2864.00 (M)	294.00 (M)	1.25 (B)	12.00 (B)	0.97 (B)	26.80 (A)
Alto Lucero	Sta Sofía	Potrero	14.60 (B)	18.34 (B)	285.00 (M)	2739.00 (M)	318.00 (M)	1.08 (B)	18.00 (M)	1.43 (B)	24.80 (M)

Alto Lucero	Topilito	Potrero	11.71 (B)	16.96 (B)	125.36 (B)	814.29 (B)	233.48 (B)	7.50 (A)	35.60 (A)	1.95 (M)	18.00 (M)
Nautla	4 Caminos	Potrero	23.14 (M)	17.25 (B)	36.88 (B)	3759.82 (A)	345.09 (A)	6.15 (A)	8.20 (B)	1.20 (B)	28.50 (A)
Misantla	La Valle	Potrero	6.80 (B)	9.34 (B)	263.00 (M)	1936.00 (B)	254.0 (M)	0.84 (B)	28.00 (A)	1.95 (M)	18.30 (M)
San Rafael	A. Zarco	Corral	8.40 (B)	8.31 (B)	297.00 (M)	3864.00 (A)	349.00 (A)	1.02 (B)	11.00 (B)	1.34 (B)	36.80 (A)
Alto Lucero	Colorado	Corral	7.60 (B)	7.31 (B)	319.00 (A)	3461.00 (A)	364.00 (A)	1.50 (B)	13.00 (B)	0.88 (B)	34.80 (A)
Nautla	Raudal	Corral	17.15 (B)	16.90 (B)	97.56 (B)	521.00 (B)	217.88 (B)	7.12 (A)	37.75 (A)	1.87 (M)	16.20 (M)
Alto Lucero	Colorado	Cerco	15.78 (B)	14.42 (B)	311.45 (M)	2947.85 (M)	418.65 (A)	4.12 (A)	15.33 (B)	1.52 (B)	18.93 (M)
San Rafael	Aldama	Cerco	8.30 (B)	12.18 (B)	374.00 (A)	3971.00 (A)	364.00 (A)	1.23 (B)	16.00 (M)	1.05 (B)	34.80 (A)
Alto Lucero	Sta Sofía	Cerco	15.22 (B)	12.93 (B)	296.52 (M)	2793.55 (M)	371.21 (A)	5.30 (A)	18.70 (M)	1.72 (M)	20.11 (M)
Tecolutla	El Abanico	Corral	8.40 (B)	7.17 (B)	385.00 (A)	2145.00 (M)	257.0 (M)	1.51 (B)	19.00 (M)	1.01 (B)	16.80 (M)
V. Alatorre	El Laurel	Corral	24.51 (M)	19.33 (B)	72.25 (B)	3840.30 (A)	417.25 (A)	3.12 (B)	16.40 (M)	1.12 (B)	26.81 (A)
Nautla	La Aurora	Corral	15.62 (B)	16.11 (B)	269.77 (M)	3283.09 (A)	364.99 (A)	2.34 (B)	19.60 (M)	1.46 (B)	19.44 (M)
Nautla	Raudal	Potrero	18.77 (B)	32.51 (M)	118.95 (B)	586.30 (B)	193.04 (B)	3.19 (B)	20.05 (M)	1.72 (M)	17.11 (M)
Misantla	San Felipe	Potrero	24.51 (M)	14.70 (B)	192.56 (M)	425.80 (B)	181.15 (B)	6.22 (A)	17.14 (M)	1.85 (M)	15.33 (M)
San Rafael	Sn Valentín	Cerco	17.25 (B)	16.34 (B)	274.60 (M)	2638.12 (M)	364.82 (A)	3.26 (B)	19.45 (M)	1.85 (M)	17.41 (M)
Misantla	La Valle	Cerco	16.77 (B)	19.18 (B)	259.52 (M)	2783.88 (M)	364.12 (A)	3.72 (B)	14.66 (B)	1.83 (M)	18.45 (M)
Tecolutla	Copalar	Corral	32.19 (M)	18.14 (B)	138.56 (B)	3178.44 (A)	345.81 (A)	4.17 (A)	14.78 (B)	1.15 (B)	26.35 (A)
San Rafael	BG	Potrero	14.90 (B)	17.52 (B)	85.36 (B)	3948.44 (A)	375.13 (A)	5.21 (A)	14.78 (B)	1.04 (B)	26.34 (A)
Nautla	Sta. Rosa	Potrero	16.60 (B)	14.28 (B)	97.34 (B)	3690.85 (A)	450.44 (A)	4.68 (A)	11.52 (B)	0.93 (B)	27.30 (A)
Alto Lucero	Las Torres	Corral	12.60 (B)	5.34 (B)	285.00 (M)	3739.00 (A)	418.00 (A)	2.08 (B)	8.00 (B)	1.13 (B)	27.80 (A)
Tlapacoyan	El Clarín	Corral	17.45 (B)	14.68 (B)	261.03 (M)	2363.57 (M)	428.74 (A)	6.24 (A)	22.50 (M)	1.93 (M)	18.35 (M)
Nautla	Buenavista	Cerco	14.62 (B)	16.82 (B)	270.00 (M)	2310.13 (M)	272.05 (M)	6.39 (A)	24.67 (M)	1.95 (M)	15.89 (M)
Atzalan	La Soledad	Potrero	26.45 (M)	16.82 (B)	234.80 (M)	3692.50 (A)	473.70 (A)	3.27 (B)	8.52 (B)	0.83 (B)	35.61 (A)
Alto Lucero	Topilito	Corral	48.65 (A)	25.93 (M)	106.74 (B)	915.04 (B)	263.55 (M)	7.50 (A)	19.21 (M)	1.17 (B)	26.52 (A)
Misantla	Acosta	Potrero	15.70 (B)	14.36 (B)	99.51 (B)	3682.12 (A)	372.00 (A)	4.70 (A)	15.22 (B)	1.03 (B)	27.91 (A)
Tecolutla	Mangos	Cerco	13.26 (B)	14.19 (B)	279.55 (M)	2845.99 (M)	382.17 (A)	4.78 (A)	12.23 (B)	1.64 (M)	19.45 (M)

Tecolutla	Hueytepec	Cerco	17.42 (B)	18.01 (B)	382.43 (A)	3648.03 (A)	411.22 (A)	3.74 (B)	13.09 (B)	1.21 (B)	28.52 (A)
San Rafael	Sn Valentín	Corral	16.93 (B)	13.72 (B)	294.66 (M)	2591.84 (M)	274.71 (M)	6.39 (A)	22.81 (M)	2.02 (M)	16.42 (M)
V. Alatorre	El Laurel	Cerco	19.31 (B)	21.18 (M)	98.59 (B)	3852.77 (A)	391.37 (A)	4.33 (A)	18.20 (M)	1.28 (B)	28.05 (A)
Alto Lucero	Topilito	Cerco	22.35 (M)	23.38 (M)	163.12 (M)	817.80 (B)	187.13 (B)	3.28 (B)	12.78 (B)	1.52 (B)	22.50 (M)
Tecolutla	Mangos	Corral	14.65 (B)	16.60 (B)	295.53 (M)	2902.00 (M)	392.06 (A)	5.38 (A)	13.77 (B)	1.16 (B)	28.35 (A)
San Rafael	A. Zarco	Cerco	12.63 (B)	18.55 (B)	265.88 (M)	3892.30 (A)	386.25 (A)	6.14 (A)	21.13 (M)	0.91 (B)	33.62 (A)
Tlapacoyan	La Ordeña	Potrero	23.08 (M)	22.16 (M)	119.31 (B)	3131.66 (A)	417.79 (A)	5.31 (A)	20.34 (M)	1.53 (B)	27.08 (A)
Tecolutla	Abanico	Cerco	14.95 (B)	13.28 (B)	351.77 (A)	3628.50 (A)	479.25 (A)	3.57 (B)	16.92 (M)	1.03 (B)	18.95 (M)
Misantla	Carreón	Cerco	14.30 (B)	11.67 (B)	118.95 (B)	3722.41 (A)	402.55 (A)	5.48 (A)	16.13 (M)	1.32 (B)	27.83 (A)
Alto Lucero	Colorado	Potrero	13.19 (B)	9.54 (B)	287.27 (M)	2783.11 (M)	359.44 (A)	3.86 (A)	17.03 (M)	1.25 (B)	25.63 (A)
San Rafael	A. Zarco	Potrero	16.55 (B)	21.39 (M)	287.35 (M)	3278.44 (A)	379.02 (A)	3.12 (B)	17.17 (M)	0.94 (B)	31.16 (A)
San Rafael	La Aurora 2	Potrero	12.56 (B)	13.78 (B)	301.66 (M)	2981.99 (M)	371.01 (A)	4.28 (A)	16.06 (M)	1.36 (B)	20.83 (M)
Tecolutla	Copalar	Potrero	32.88 (M)	24.50 (M)	191.12 (M)	2953.08 (M)	397.05 (A)	3.63 (B)	13.92 (B)	1.18 (B)	29.88 (A)
Juchique	Sn Patricio	Potrero	16.55 (B)	9.26 (B)	317.40 (A)	4138.31 (A)	653.05 (A)	3.88 (A)	11.20 (B)	0.58 (B)	31.94 (A)
Nautla	4 Caminos	Corral	25.24 (M)	20.07 (M)	211.36 (M)	3617.40 (A)	385.66 (A)	6.31 (A)	14.60 (B)	1.20 (B)	28.52 (A)
Juchique	Sn Patricio	Cerco	19.21 (B)	12.11 (B)	311.55 (M)	4285.70 (A)	658.37 (A)	5.36 (A)	10.19 (B)	0.63 (B)	34.50 (A)
Nautla	Ciruelo	Cerco	17.90 (B)	17.44 (B)	271.40 (M)	3028.33 (A)	364.88 (A)	4.22 (A)	18.90 (M)	1.07 (B)	28.44 (A)
Misantla	P. Viejo	Cerco	16.23 (B)	13.72 (B)	148.84 (B)	4211.35 (A)	471.31 (A)	3.18 (B)	10.30 (B)	0.73 (B)	31.04 (A)
Tlapacoyan	A. Piedra	Corral	52.31 (A)	43.67 (M)	152.30 (B)	1814.55 (B)	315.78 (M)	3.20 (B)	27.45 (A)	1.56 (B)	20.91 (M)
Misantla	Sn Felipe	Cerco	28.54 (M)	16.84 (B)	148.99 (B)	517.03 (B)	171.44 (B)	5.20 (A)	16.70 (M)	1.71 (M)	20.56 (M)
Tecolutla	Abanico	Potrero	13.92 (B)	15.98 (B)	371.22 (A)	3275.06 (A)	418.50 (A)	5.33 (A)	14.80 (B)	1.17 (B)	25.30 (A)
San Rafael	Sn Carlos	Cerco	19.55 (B)	15.71 (B)	95.53 (B)	3056.32 (A)	428.44 (A)	6.91 (A)	13.82 (B)	1.02 (B)	30.04 (A)
Nautla	Buenavista	Potrero	15.03 (B)	19.03 (B)	271.44 (M)	2381.22 (M)	253.38 (M)	4.12 (A)	25.32 (M)	1.96 (M)	17.82 (M)
Alto Lucero	Las Torres	Potrero	18.31 (B)	15.30 (B)	358.92 (A)	4271.44 (A)	628.14 (A)	6.23 (A)	7.80 (B)	0.72 (B)	29.71 (A)
Tecolutla	Copalar	Cerco	28.12 (M)	19.56 (B)	251.18 (M)	3719.72 (A)	448.56 (A)	5.08 (A)	9.73 (B)	0.91 (B)	33.19 (A)
Colipa	Los Pérez	Potrero	11.43 (B)	15.72 (B)	319.07 (A)	3765.11 (A)	415.70 (A)	6.11 (A)	14.02 (B)	0.80 (B)	30.59 (A)
Alto Lucero	Sta Sofía	Corral	18.41 (B)	11.23 (B)	273.18 (M)	2692.92 (M)	275.66 (M)	6.91 (A)	23.85 (M)	1.87 (M)	16.32 (M)

Nautla	Buenavista	Corral	24.20 (M)	17.55 (B)	289.25 (M)	2374.29 (M)	241.70 (M)	3.58 (B)	26.71 (A)	1.92 (M)	15.63 (M)
Tlapacoyan	A. Piedra	Potrero	28.56 (M)	37.43 (M)	170.83 (M)	2284.53 (M)	284.02 (M)	6.18 (A)	29.31 (A)	1.47 (B)	21.93 (M)
Tlapacoyan	El Clarín	Cerco	20.78 (M)	13.85 (B)	232.72 (M)	2873.05 (M)	312.04 (M)	3.71 (B)	26.18 (A)	2.03 (M)	17.11 (M)
Nautla	4 Caminos	Cerco	22.73 (M)	17.17 (B)	267.44 (M)	4017.72 (A)	462.81 (A)	4.92 (A)	11.73 (B)	0.78 (B)	32.01 (A)
Tlapacoyan	La Garita	Potrero	21.17 (M)	21.89 (M)	162.67 (M)	3258.90 (A)	397.04 (A)	3.75 (B)	19.53 (M)	1.43 (B)	24.31 (M)
San Rafael	P. Aldama	Potrero	14.88 (B)	18.06 (B)	171.68 (M)	3492.03 (A)	394.61 (A)	3.78 (B)	16.31 (M)	1.29 (B)	22.93 (M)
San Rafael	BG	Cerco	18.95 (B)	17.11 (B)	108.33 (B)	3742.94 (A)	412.80 (A)	2.84 (B)	17.32 (M)	1.11 (B)	24.99 (M)
Colipa	Sn Julián	Potrero	12.38 (B)	18.95 (B)	163.44 (M)	4052.88 (A)	482.48 (A)	4.72 (A)	11.75 (B)	0.82 (B)	30.22 (A)
Colipa	Sn Julián	Corral	17.74 (B)	11.32 (B)	184.55 (M)	4106.88 (A)	492.08 (A)	6.71 (A)	10.93 (B)	0.74 (B)	31.27 (A)
Alto Lucero	Las Torres	Cerco	12.60 (B)	16.32 (B)	285.38 (M)	2893.56 (M)	375.83 (A)	3.49 (B)	16.84 (M)	1.32 (B)	17.55 (M)
V. Alatorre	Paso Chilares	Cerco	19.82 (B)	30.15 (M)	172.9 (M)	985.6 (B)	198.41 (B)	3.82 (A)	29.72 (A)	1.78 (M)	27.51 (A)
V. Alatorre	Laurel	Potrero	15.19 (B)	16.82 (B)	284.59 (M)	3984.05 (A)	408.55 (A)	5.92 (A)	10.02 (B)	0.46 (B)	10.35 (B)
Martínez	Zanjas Arena	Potrero	21.83 (M)	28.71 (M)	168.90 (M)	974.30 (B)	185.22 (B)	4.02 (A)	28.56 (A)	1.83 (M)	29.43 (A)
Colipa	Isleta	Cerco	19.16 (B)	24.85 (M)	271.25 (M)	2183.65 (M)	322.84(M)	5.52 (A)	21.60 (M)	1.36 (B)	28.55 (A)
Martínez	M de la Torre	Cerco	22.18 (M)	31.60 (M)	186.88 (M)	921.30 (B)	173.05 (B)	3.82 (A)	31.77 (A)	1.91 (M)	34.15 (A)
V. Alatorre	La Ceiba	Potrero	19.56 (B)	19.74 (B)	278.33 (M)	3419.15 (A)	372.90 (A)	4.13 (A)	14.32 (B)	1.17 (B)	15.03 (M)
Martínez	La Zanja	Corral	22.80 (M)	18.57 (B)	296.33 (M)	3958.11 (A)	412.90 (A)	5.82 (A)	13.10 (B)	0.83 (B)	11.05 (B)
Juchique	Técnica	Potrero	15.06 (B)	14.65 (B)	319.01 (A)	2675.44 (M)	248.01(M)	3.55 (B)	21.06 (M)	1.89 (M)	17.22 (M)
Martínez	La Unión	Potrero	14.52 (B)	15.33 (B)	308.47 (M)	3108.55 (A)	342.55 (A)	6.37 (A)	19.54 (M)	1.52 (B)	23.03 (M)
Juchique	Corralitos	Corral	13.61 (B)	13.22 (B)	323.03 (A)	4104.03 (A)	478.22 (A)	4.28 (A)	11.97 (B)	0.73 (B)	34.61 (A)
Yecuatla	Chanita	Potrero	18.86 (B)	14.65 (B)	140.30 (B)	3677.12 (A)	392.60 (A)	4.29 (A)	15.90 (B)	1.22 (B)	26.92 (A)
Colipa	Ejido Viejo	Potrero	16.72 (B)	17.83 (B)	215.34 (M)	2374.63 (M)	317.44 (M)	5.08 (A)	22.00 (M)	1.73 (M)	19.58 (M)
Yecuatla	Chanita	Cerco	17.59 (B)	19.70 (B)	283.95 (M)	3721.32 (A)	375.90 (A)	3.74 (B)	17.36 (M)	1.11 (B)	18.56 (M)
Atzalan	EL Pimiento	Corral	21.15 (M)	28.72 (M)	183.12 (M)	1850.75 (B)	275.44(M)	3.74 (B)	22.30 (M)	1.54 (B)	22.65 (M)
Yecuatla	2 Arroyos	Corral	20.16 (M)	19.80 (B)	283.09 (M)	3917.85 (A)	364.62 (A)	6.22 (A)	14.80 (B)	1.04 (B)	30.59 (A)
Atzalan	Del Rincón	Corral	21.95 (M)	22.40 (M)	128.43 (B)	3644.71 (A)	328.44(M)	3.70 (B)	20.18 (M)	1.36 (B)	25.37 (A)
Martínez	La Zanja	Potrero	19.53 (B)	15.65 (B)	284.60 (M)	4017.88 (A)	385.71 (A)	3.96 (A)	9.50 (B)	0.53 (B)	11.78 (B)

San Rafael	San Carlos	Potrero	24.16 (M)	26.11 (M)	275.24 (M)	3617.55 (A)	351.80(A)	5.16 (A)	12.55 (B)	0.87 (B)	12.70 (M)
V. Alatorre	La Ceiba	Cerco	18.55 (B)	10.05 (B)	296.51 (M)	3027.80 (M)	347.12(A)	5.31 (A)	19.49 (M)	1.42 (B)	27.31 (A)
Martínez	La Unión	Cerco	17.53 (B)	26.40 (M)	297.72 (M)	3284.06 (A)	315.21(M)	4.62 (A)	12.19 (B)	1.13 (B)	19.50 (M)
Juchique	El Palmar	Potrero	19.13 (B)	15.62 (B)	281.22 (M)	3607.47 (A)	328.50(M)	3.19 (B)	16.33 (M)	1.10 (B)	29.31 (A)
Yecuatla	El Cuecha	Corral	22.30 (M)	14.06 (B)	138.26 (B)	3416.60 (A)	417.21 (A)	3.72 (B)	17.33 (M)	1.08 (B)	27.84 (A)
Alto Lucero	EL Desafío	Potrero	19.45 (B)	22.97 (M)	251.72 (M)	2962.55 (M)	218.70(B)	3.87 (A)	21.33 (M)	1.28 (B)	18.92 (M)
Juchique	Loma Alta	Potrero	20.67 (M)	19.44 (B)	112.51 (B)	3894.66 (A)	316.83(M)	5.22 (A)	17.09 (M)	1.47 (B)	27.03 (A)
Yecuatla	Chanita	Corral	18.06 (B)	12.16 (B)	137.88 (B)	3670.86 (A)	360.05 (A)	5.52 (A)	17.00 (M)	1.16 (B)	28.55 (A)
Juchique	Loma Alta	Corral	21.45 (M)	23.60 (M)	215.44 (M)	3461.80 (A)	321.5 (M)	4.23 (A)	19.70 (M)	1.32 (B)	21.04 (M)
Colipa	La Defensa	Corral	21.55 (M)	29.32 (M)	248.9 (M)	2085.12 (B)	328.94 (M)	3.44 (B)	22.06 (M)	1.52 (B)	31.00 (A)
Nautla	La Aurora	Potrero	16.90 (B)	17.52 (B)	286.93 (M)	3851.06 (A)	386.65 (A)	4.16 (A)	17.62 (M)	0.86 (B)	18.52 (M)
Juchique	Corralitos	Cerco	18.33 (B)	15.60 (B)	319.50 (A)	3852.41 (A)	412.77 (A)	3.97 (A)	11.64 (B)	0.72 (B)	11.60 (B)
Juchique	Palmar	Corral	20.88 (M)	18.90 (B)	293.78 (M)	3581.66 (A)	364.22 (A)	3.08 (B)	16.45 (M)	1.03 (B)	17.55 (M)
V. Alatorre	EL Vado	Cerco	17.82 (B)	26.73 (M)	284.80 (M)	2153.32 (M)	284.0 (M)	4.19 (A)	28.12 (A)	1.75 (M)	27.11 (A)
Colipa	La Defensa	Potrero	23.94 (M)	28.26 (M)	239.63 (M)	2184.03 (M)	287.35 (M)	3.26 (B)	27.55 (A)	1.60 (B)	29.68 (A)
Martínez	La Zanja	Cerco	20.63 (M)	18.21 (B)	279.45 (M)	3984.17 (A)	394.05 (A)	4.0 (A)	12.56 (B)	0.81 (B)	13.28 (M)
V. Alatorre	El Vado	Potrero	20.45 (M)	27.39 (M)	263.50 (M)	2292.38 (M)	291.6 (M)	3.12 (B)	27.19 (A)	1.80 (M)	26.33 (A)
Colipa	Los Pérez	Cerco	20.11 (M)	19.31 (B)	293.05 (M)	4082.0 (A)	397.5 (A)	4.18 (A)	11.25 (B)	0.49 (B)	10.62 (B)
Colipa	Isleta	Potrero	17.53 (B)	18.90 (B)	271.88 (M)	4174.23 (A)	436.31 (A)	3.75 (B)	11.54 (B)	0.51 (B)	12.07 (M)
Colipa	La Defensa	Cerco	19.72 (B)	25.9 (M)	217.13 (M)	2150.62 (M)	290.05 (M)	4.10 (A)	28.31 (A)	1.58 (B)	30.45 (A)
Yecuatla	La Loma	Potrero	17.60 (B)	17.29 (B)	304.86 (M)	3260.77 (A)	401.56 (A)	6.44 (A)	12.48 (B)	1.09 (B)	30.61 (A)
Yecuatla	2 Arroyos	Cerco	22.56 (M)	22.70 (M)	294.08 (M)	3851.80 (A)	372.93 (A)	5.17 (A)	13.44 (B)	0.89 (B)	16.14 (M)
Colipa	Ejido Viejo	Corral	18.75 (B)	27.40 (M)	182.93 (M)	2284.29 (M)	273.0 (M)	3.16 (B)	25.83 (A)	1.82 (M)	27.44 (A)
Juchique	Corralitos	Potrero	16.28 (B)	19.63 (B)	314.22 (M)	3871.40 (A)	398.11 (A)	5.88 (A)	10.07 (B)	0.43 (B)	12.18 (M)
Juchique	El puente	Corral	22.19 (M)	26.60 (M)	312.88 (M)	4073.09 (A)	417.55 (A)	3.97 (A)	10.83 (B)	0.62 (B)	11.04 (B)
V. Alatorre	Paso Chilares	Potrero	21.14 (M)	29.76 (M)	194.05 (M)	1064.00 (B)	206.92 (B)	3.19 (B)	31.70 (A)	2.08 (M)	29.55 (A)
Yecuatla	El Cuecha	Cerco	19.45 (B)	21.13 (M)	293.16 (M)	3827.53 (A)	374.12 (A)	3.82 (A)	18.64 (M)	0.83 (B)	19.57 (M)
Colipa	Los Pérez	Corral	21.48 (M)	19.62 (B)	283.11 (M)	4072.70 (A)	456.31 (A)	4.26 (A)	11.78 (B)	0.68 (B)	12.40 (M)

V. Alatorre	La Ceiba	Corral	21.50 (M)	28.42 (M)	287.44 (M)	3725.13 (A)	392.4 (A)	5.11 (A)	17.30 (M)	1.03 (B)	16.45 (M)
V. Alatorre	El Vado	Corral	19.45 (B)	22.53 (M)	247.35 (M)	2164.93 (M)	263.9 (M)	3.86 (A)	26.30 (A)	1.64 (M)	28.59 (A)
Yecuatla	El Cuecha	Potrero	22.19 (M)	18.64 (B)	293.78 (M)	3827.60 (A)	382.43 (A)	4.52 (A)	16.70 (M)	0.76 (B)	20.19 (M)
Atzalan	Del Rincón	Cerco	26.54 (M)	28.37 (M)	243.7 (M)	3581.15 (A)	372.1 (A)	3.18 (B)	21.83 (M)	1.15 (B)	19.72 (M)
Martínez	La Unión	Corral	19.65 (B)	24.52 (M)	316.9 (M)	3317.22 (A)	314.91 (M)	3.84 (A)	16.45 (M)	1.06 (B)	15.74 (M)
Yecuatla	2 Arroyos	Potrero	28.95 (M)	18.39 (B)	316.52 (M)	3983.05 (A)	317.66 (M)	4.18 (A)	14.33 (B)	0.78 (B)	19.35 (M)

N: nitrógeno; P: fosforo; K: potasio; Ca: calcio; Mg: magnesio; Cu: cobre; F: hierro; Z: zinc; Mn: manganeso; Mg: miligramos; Kg: kilogramos; B: bajo; M: medio; A: alto.

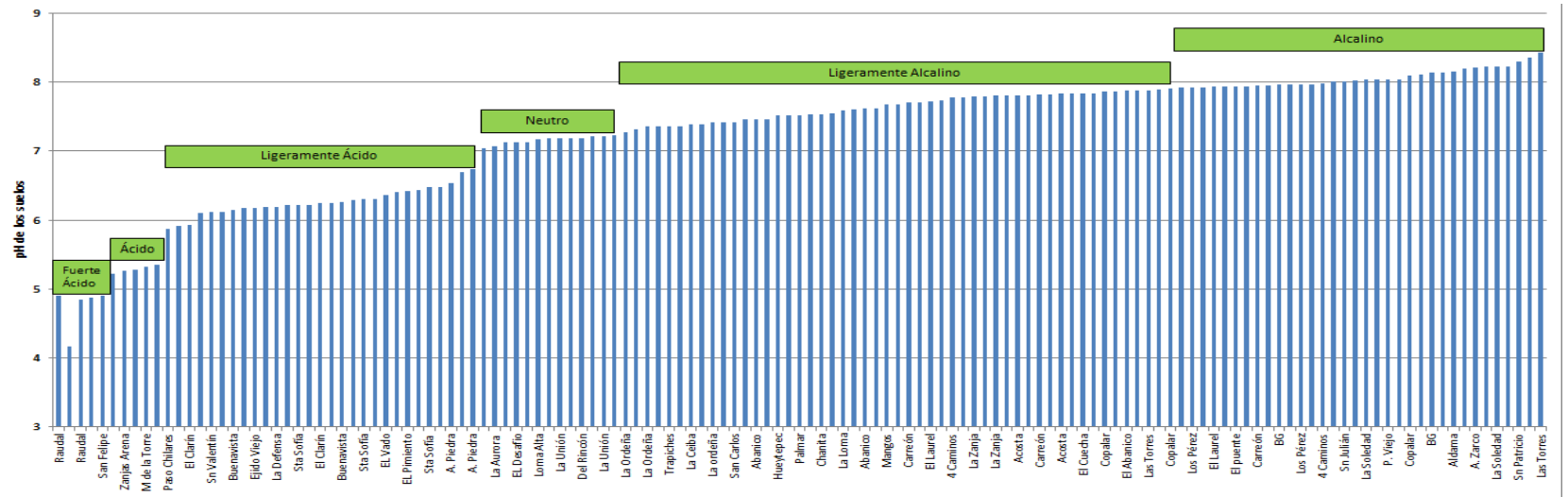


Figura 13. pH de los suelos muestreados de las UPB en Veracruz, México.

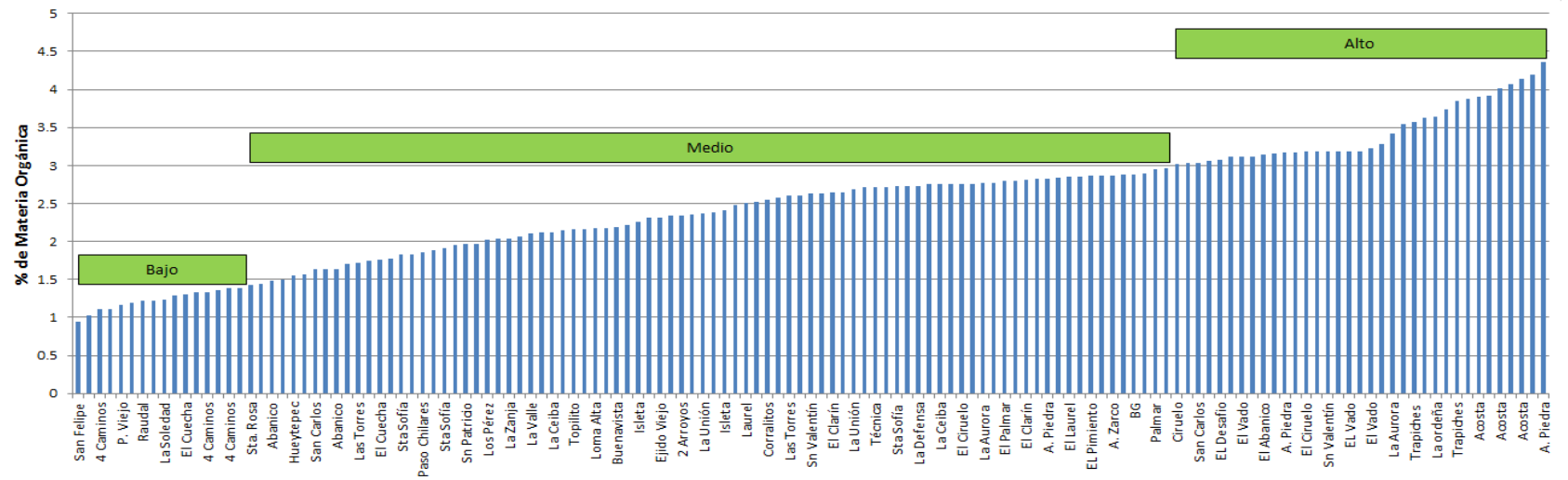


Figura 14. Porcentaje de materia orgánica de los suelos muestreados de las UPB.

Los resultados del análisis de los componentes químicos de los suelos muestreados en las UPB se presentan en el cuadro 6. La mayor cantidad de suelos tuvieron niveles bajos de nitrógeno (92 [67.1 %]), y sólo dos muestras tuvieron niveles altos (1.5 %) (Figura 15).

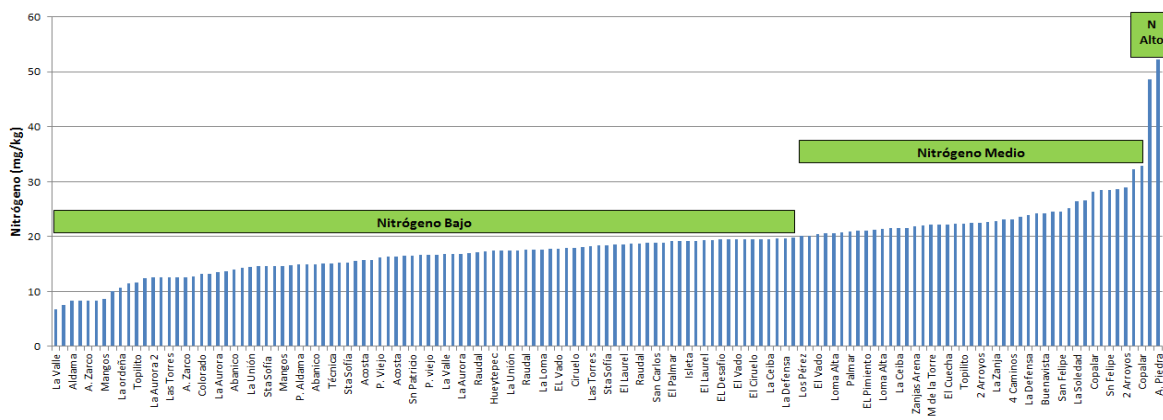


Figura 15. Niveles de nitrógeno encontrados en suelos de las UPB.

Cien muestras de suelo (73 %) mostraron niveles bajos de fosforo (5.34 - 19.80 mg/kg) y el resto (37 [27 %]) niveles medios. Ninguno de los suelos utilizados para la producción de bovinos mostró riqueza de este componente (Figura 16).

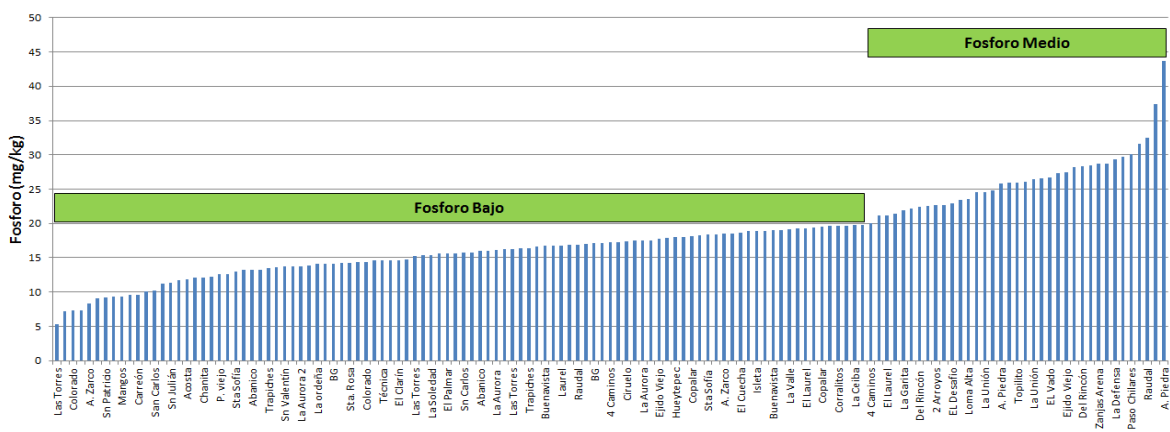


Figura 16. Niveles de fosforo encontrados en suelos de las UPB.

Con respecto al potasio, 91 muestras de suelos (66.4 %) tienen niveles promedio, incluso, 15 muestras de suelos (10.9 %) mostraron ser ricos en este componente. Se observó que 31 (22.7 %) suelos de las UPB son pobres en la cantidad de potasio (Figura 17).

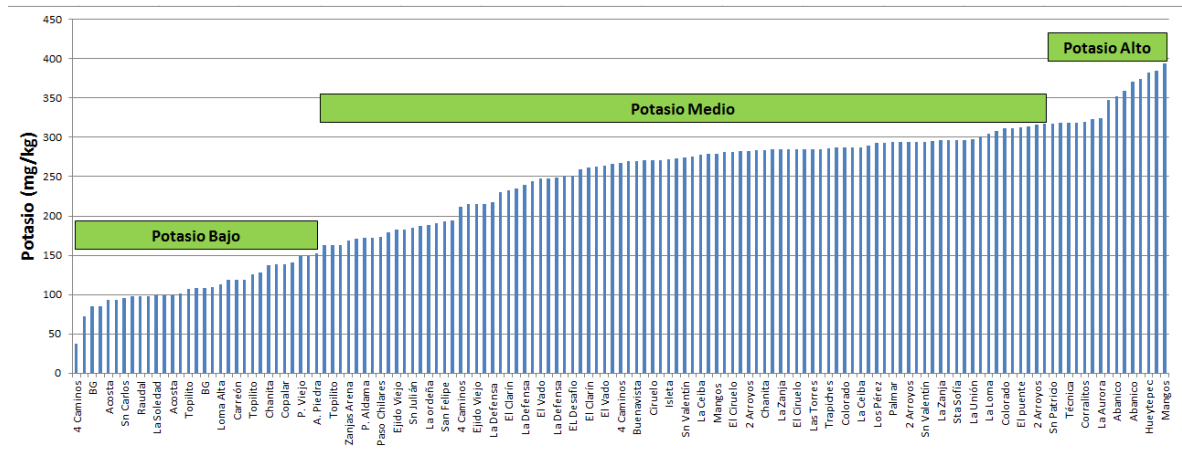


Figura 17. Niveles de potasio encontrados en suelos de las UPB.

Los suelos de las UPB son altos en calcio (88 [64.2 %]), aunque una parte de los suelos (16 [11.7 %]) mostraron ser carentes de este componente. El resto (33 [24.1 %]) presentaron niveles medios de calcio (Figura 18).

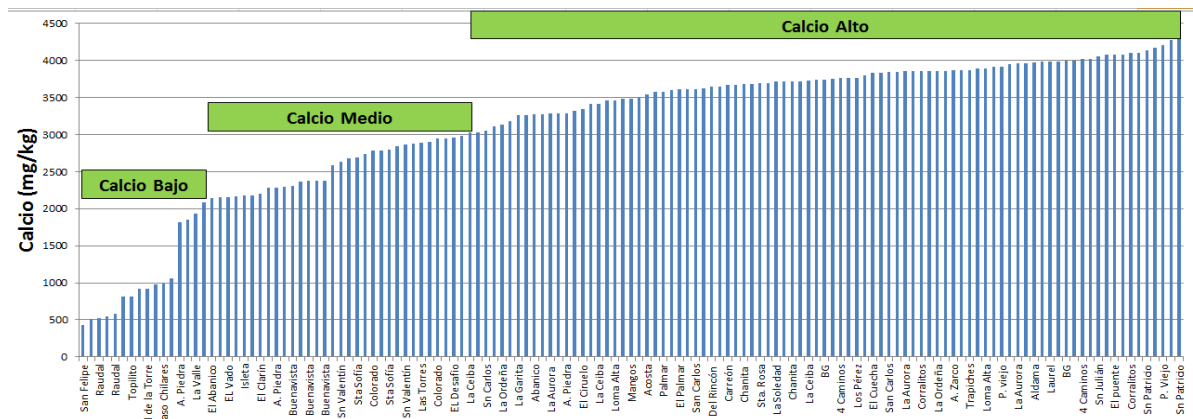


Figura 18. Niveles de calcio encontrados en suelos de las UPB.

Los niveles altos de magnesio se presentaron en el 65 % (89) de los suelos de las UPB. Solo el 8.78 % (12) manifestaron niveles bajos de este nutriente (Figura 19).

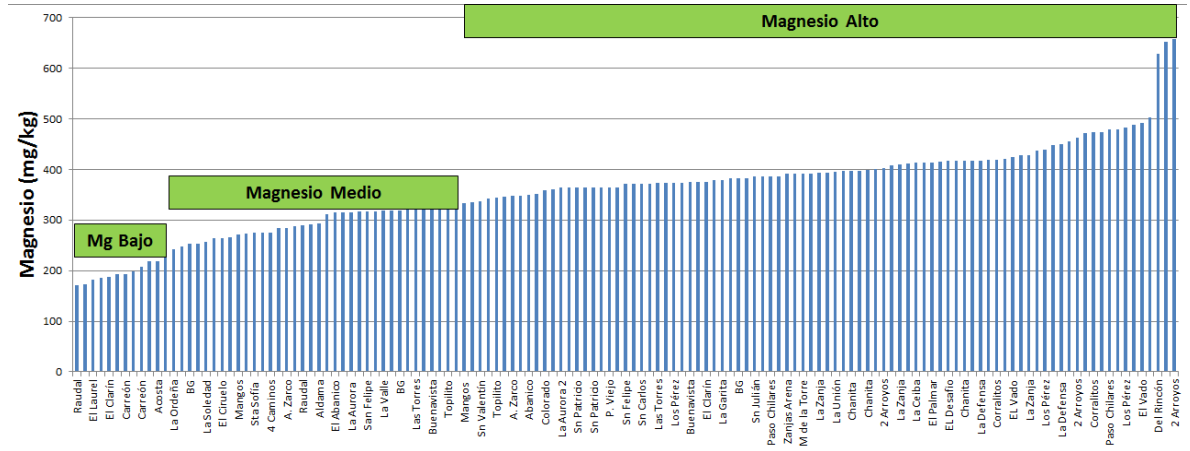


Figura 19. Niveles de magnesio encontrados en suelos de las UPB.

Un poco más de la mitad de las muestras (83 [60.6 %]) de suelo demostraron contener niveles altos en cobre. En el 39.4 % (54) de los suelos, los niveles tienden a ser bajos (Figura 20).

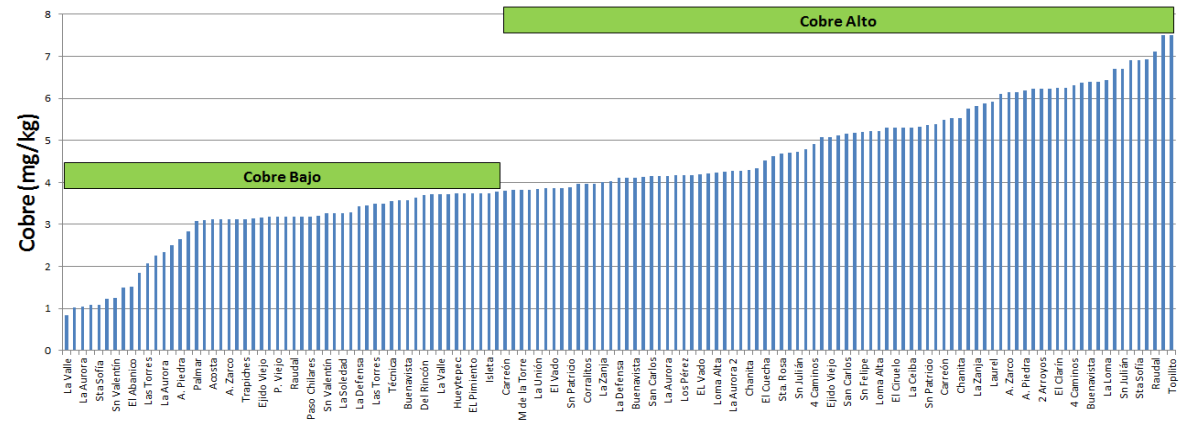


Figura 20. Niveles de cobre encontrados en suelos de las UPB.

El hierro contenido en las muestras de suelos de las UPB en general se encuentra en niveles de medio a bajo (119 [86.8 %]). Pocas UPB (18 [13.2 %]) presentan niveles altos (Figura 21).

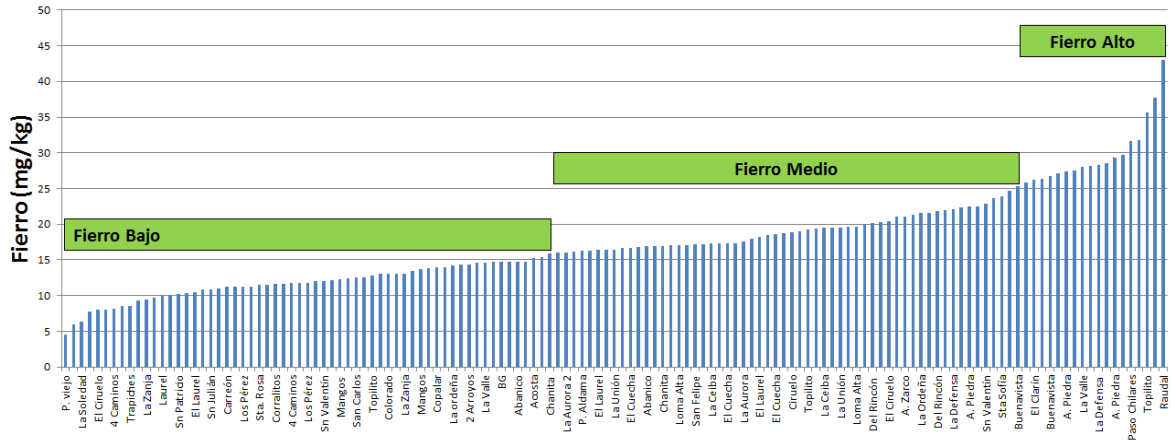


Figura 21. Niveles de hierro encontrados en suelos de las UPB.

Se encontró que los suelos de las UPB son carentes de zinc, ya solo una muestra mostró nivel alto (1 [0.7 %]), el resto niveles medio (27 [19.7 %]) y bajo (109 [79.6 %]) (Figura 22).

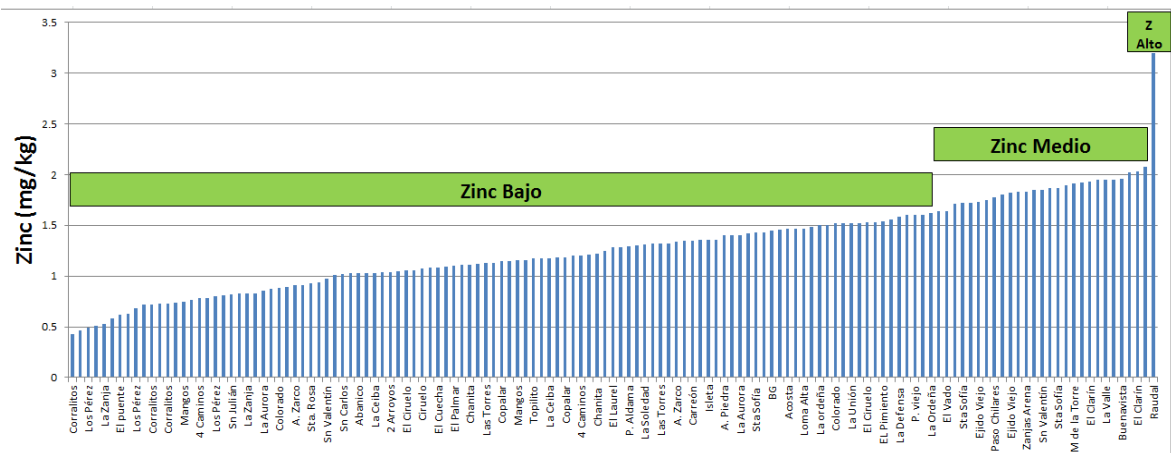


Figura 22. Niveles de zinc encontrados en suelos de las UPB.

Los suelos muestreados mostraron ser ricos en sus niveles de manganeso, ya que 72 suelos presentaron niveles altos (52.5 %) y 59 tienen niveles medios (43

%). Solo seis suelos mostraron niveles pobres (4.4 %) de este nutriente de los suelos (Figura 23).

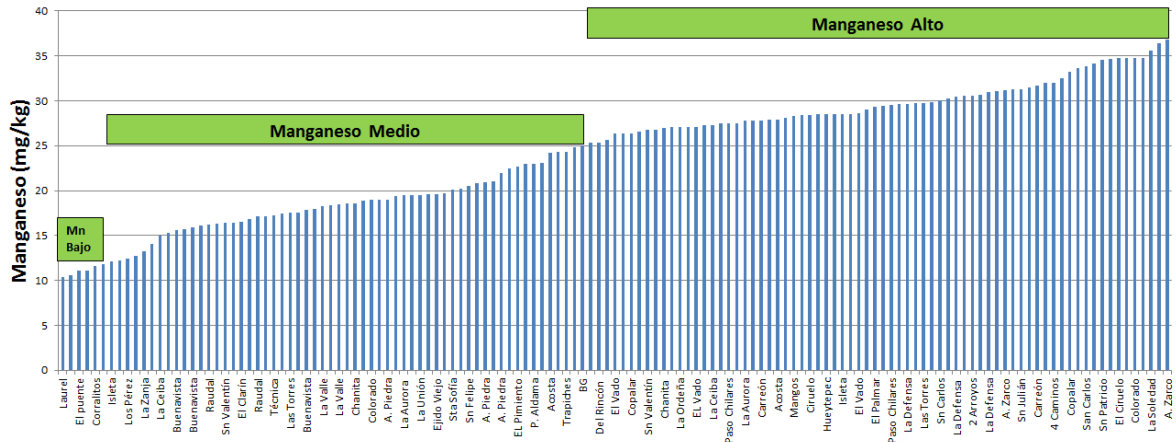
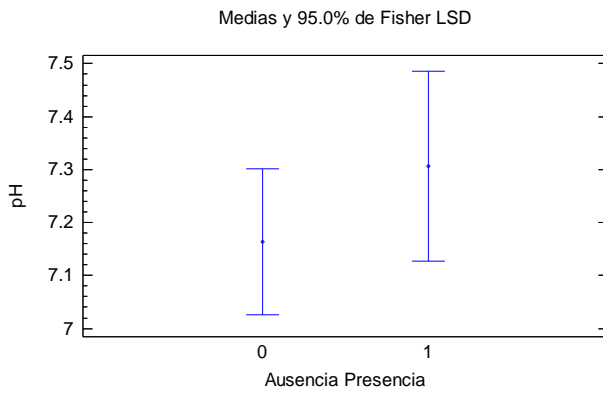


Figura 23. Niveles de manganeso encontrados en suelos de las UPB.

7.3. Efecto de los componentes químicos y físicos de los suelos sobre la ausencia o presencia de hongos entomopatógenos.

De los componentes analizados, se encontró que el porcentaje de materia orgánica influye directamente en la presencia de HE. A mayor cantidad de materia orgánica existe mayor presencia de hongos con capacidad entomopatógena ($P < 0.05$). Los componentes químicos nutricionales evaluados así como el pH no influyen en la presencia o ausencia de HE en suelos de UPB de Veracruz, México ($P > 0.05$) (Figura 24 y Figura 25).

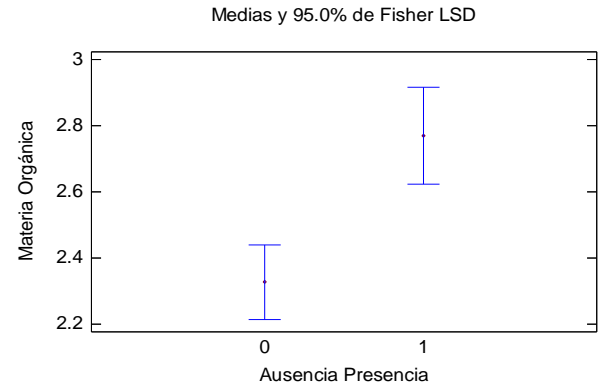
pH sobre presencia (1) /ausencia (0) de HE



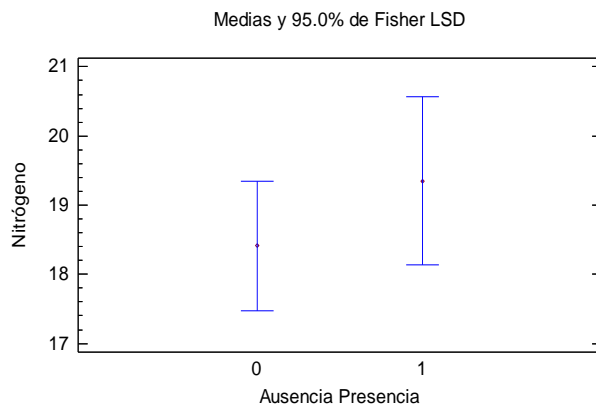
Valor-P = 0.3805

M. O. sobre presencia (1) /ausencia (0) de HE

Valor-P = 0.0011

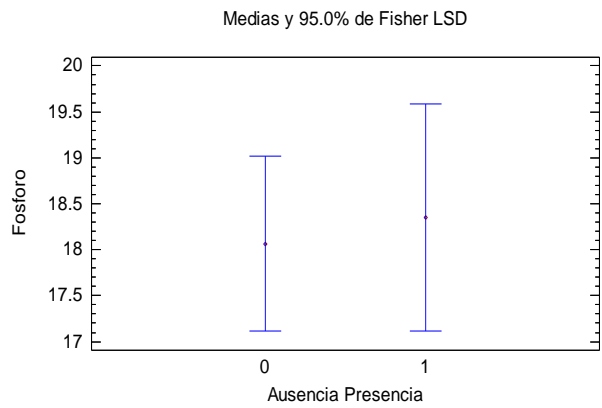


Nitrógeno sobre presencia (1) /ausencia (0) de HE



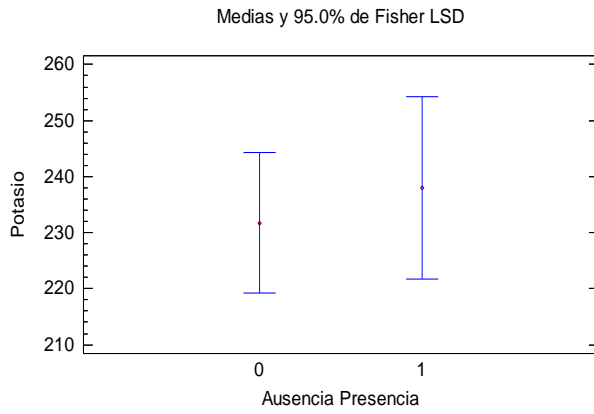
Valor-P = 0.3955

Fosforo sobre presencia (1) /ausencia (0) de HE



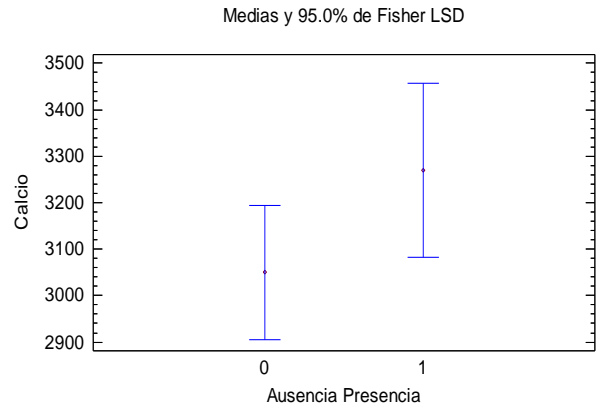
Valor-P = 0.7951

Potasio sobre presencia (1) /ausencia (0) de HE



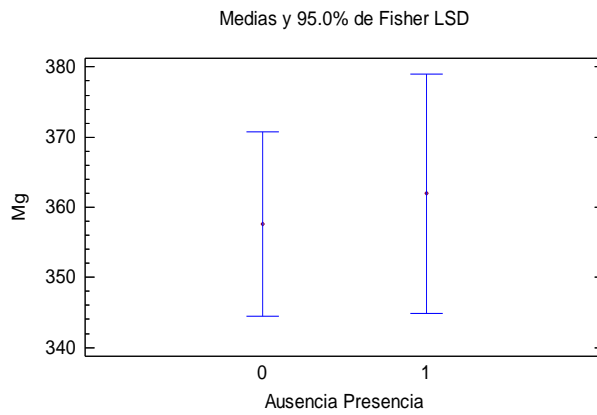
Valor-P = 0.6693

Calcio sobre presencia (1) /ausencia (0) de HE



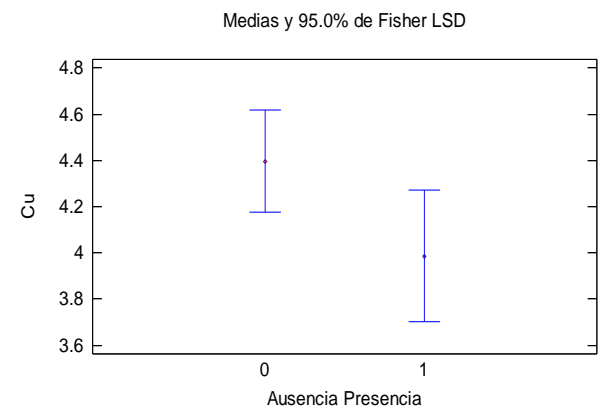
Valor de P = 0.1965

Magnesio sobre presencia (1) /ausencia (0) de HE



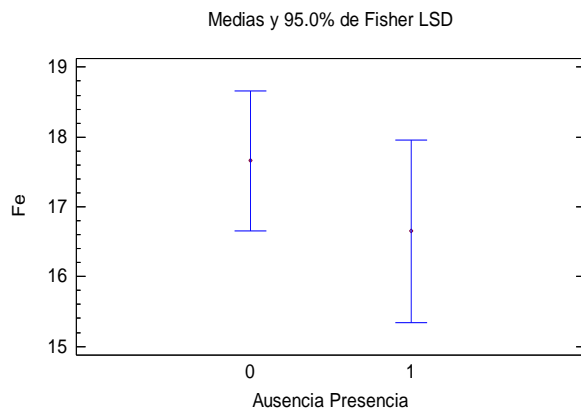
Valor-P = 0.7792

Cobre sobre presencia (1) /ausencia (0) de HE



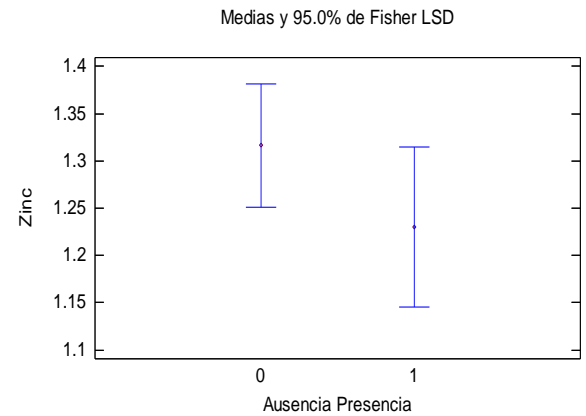
Valor-P = 0.1146

Fierro sobre presencia (1) /ausencia (0) de HE



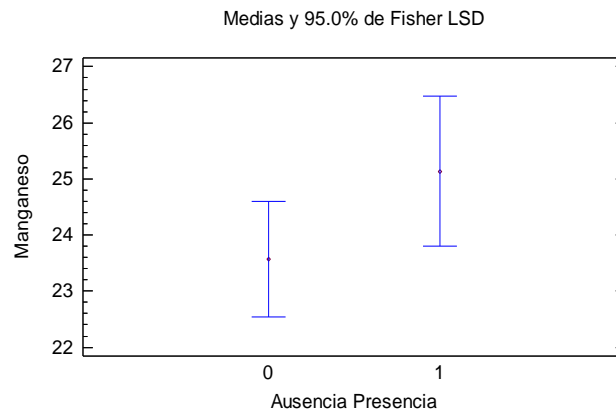
Valor-P = 0.3937

Zinc sobre presencia (1) /ausencia (0) de HE



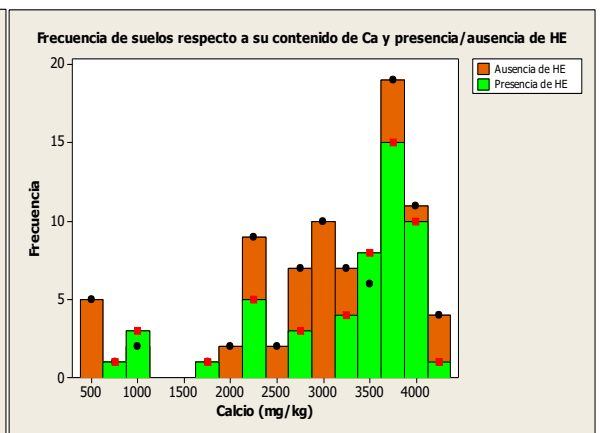
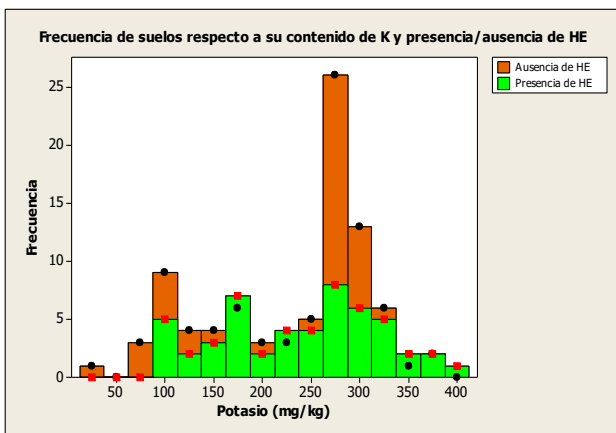
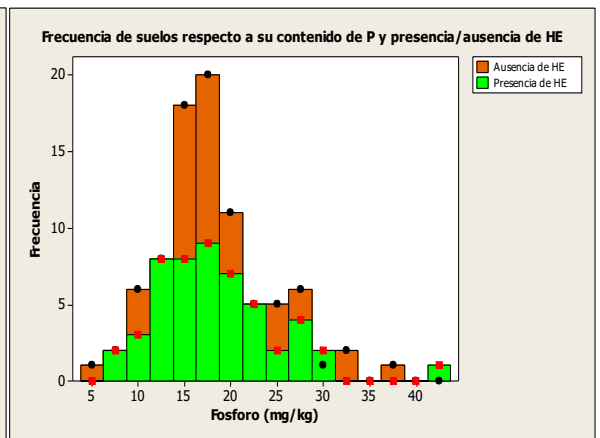
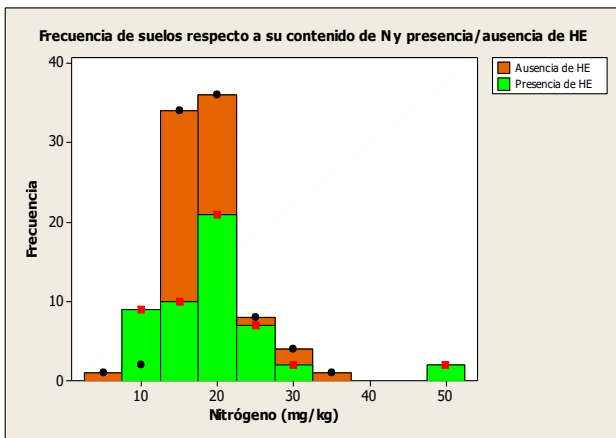
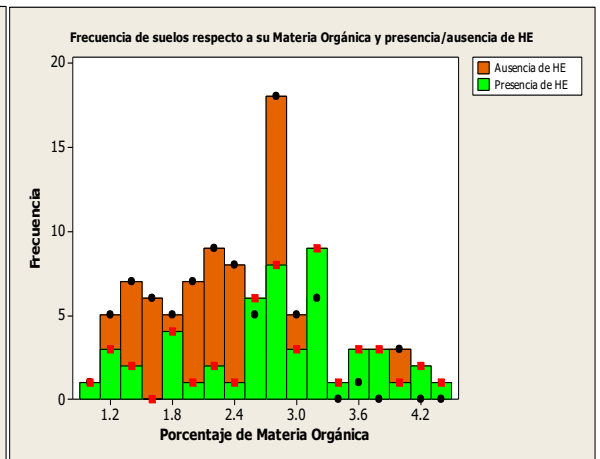
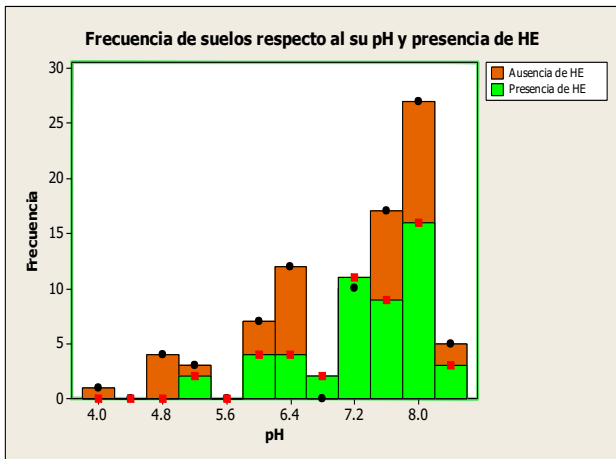
Valor-P = 0.2597

Manganeso sobre presencia (1) /ausencia (0) de HE



Valor-P = 0.1985

Figura 24. Efecto del pH, materia orgánica (M.O.) y componentes químicos de los suelos en la presencia o ausencia de HE en suelos colectados de UPB.



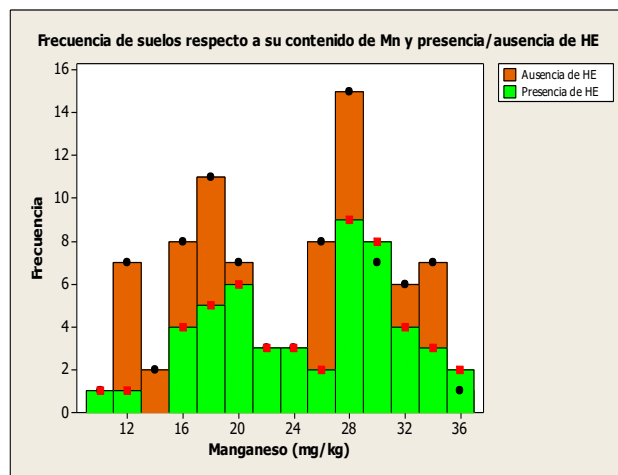
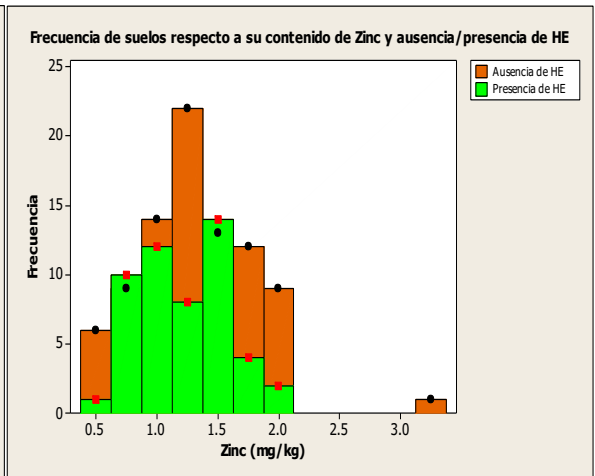
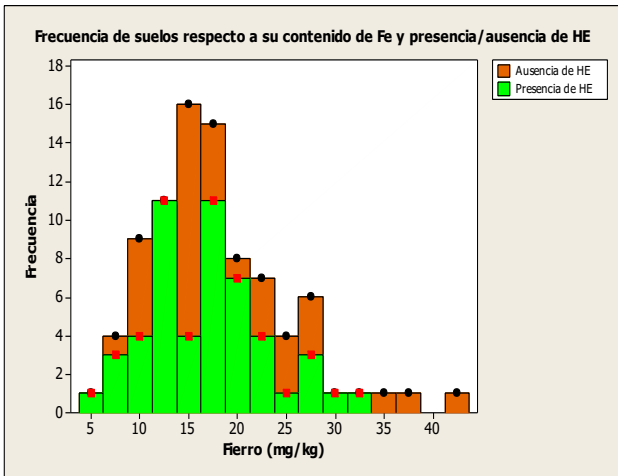
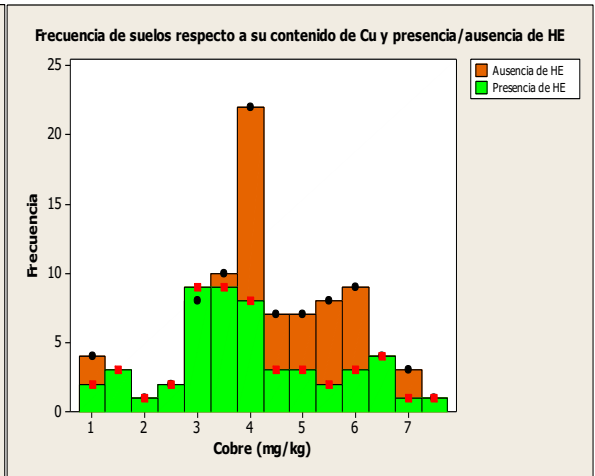
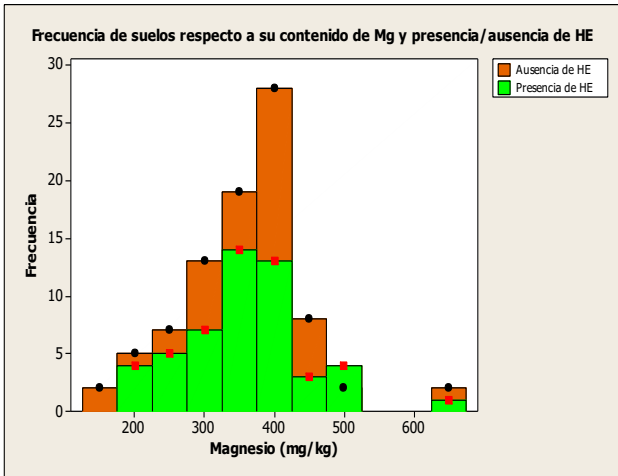


Figura 25. Frecuencia y distribución de suelos de UPB de acuerdo a su aislamiento o no aislamiento de HE y con respecto al pH, materia orgánica y componentes químicos.

7.4. Factores asociados a la presencia o ausencia de HE en las UPB

Las variables “altura de la zona” donde se tomaron las muestras de suelo y “uso de herbicidas” en las UPB, se asociaron a la ausencia de HE ($P < 0.05$). A menor altura (0 - 200 msnm) existen 2.02 veces menos oportunidad de aislar HE (OR= 2.02; $P < 0.05$). Por otro lado, las UPB que utilizan herbicidas para el control de malezas, en comparación con las que no lo usan, tienen 3.66 veces menos presencia de HE (OR= 3.66; $P < 0.05$ (Cuadro 7). Algunos otros factores como la región, el tiempo siendo UPB y la densidad vegetal, mostraron una tendencia de influir en la presencia/ausencia de HE ($P = 0.05$)

Cuadro 7. Factores asociados a la presencia/ausencia de hongos entomopatógenos aislados de suelos de UPB en Veracruz, México.

Variables	OR	IC (95%)	Chi²	Valor P
Altura				
0-200	2.02	1.02-3.99	4.80	0.0285
201-400	1	NA	NA	NA
401-600	1	NA	NA	NA
>601	1	NA	NA	NA
Uso de herbicidas				
SI	3.66	1.79-7.54	14.15	0.000169
NO	1	NA	NA	NA
Tiempo siendo				

UPB

10-20	2.38	0.83-4.01	3.72	0.053
21-30	1	NA	NA	NA
>31	1	NA	NA	NA

Región

Costera	1.99	0.93-4.28	3.71	0.05
Planicie	1	NA	NA	NA
Montañosa	1	NA	NA	NA

**Uso de
fertilizantes**

SI	0.77	0.21-1.49	0.19	0.6613
NO	1	NA	NA	NA

Hábitat

Escaso	1.32	0.53-3.34	0.19	0.66
Medio	1	NA	NA	NA
Rico	1	NA	NA	NA

**Zona
muestreada**

Alta	0.57	0.29-1.12	2.52	0.112
Baja	1	NA	NA	NA

Superficie de muestreo

Inclinada	1.34	0.60-2.98	0.33	0.56
Plana	1	NA	NA	NA

Riesgo de inundación

Inundable	1.77	0.66-4.92	1.03	0.31
No inundable	1	NA	NA	NA

Consistencia del suelo

Arenoso	0.58	0.25-1.33	1.47	0.22
Pesado	1	NA	NA	NA

Densidad vegetal

Bajo	2.15	0.98-4.82	4.23	0.05966
Medio	1	NA	NA	NA
Alto	1	NA	NA	NA

Tipo de vegetación

Nada	0.73	0.28-1.91	0.34	0.557
Maleza	1	NA	NA	NA
Pasto	1	NA	NA	NA
Árboles	1	NA	NA	NA

Tipo de suelo				
Regesol	0.68	0.33-1.39	1.32	0.25
Gleysol	1	NA	NA	NA
Luvisol	1	NA	NA	NA
Vertisol	1	NA	NA	NA
Coluvial	1	NA	NA	NA
Andosol	1	NA	NA	NA
Feosem	1	NA	NA	NA

7.5. Identificación morfológica de los HE aislados de las UPB

Se determinó que de las 68 cepas aisladas, seis correspondieron a *Beauveria bassiana* (BbV01 a BbV06), 59 a *Metarhizium anisopliae* (MaV01 a MaV59) y dos a *Paecilomyces* sp (PfV01 y PfV02).

7.5.1. Morfología de *Beauveria bassiana*

Las conidias de *B. bassiana* se observaron globosas u ovoides, con un tamaño promedio de 2 a 3 μm , hialinas, y su forma de agrupamiento en los filamentos de las células conidiógenas fue en forma de zig-zag. Las hifas fueron hialinas y septadas, los conidióforos cortos de 1 -2 μm y las células conidiógenas globosas en su base y adelgazadas en la unión con las conidias (forma de botellita) de 3 a 6 x 3 a 5 μm . Éstas formaban densos grupos en las hifas (Figura 26).

El crecimiento de las colonias fue de aproximadamente 10 días con un diámetro de 2.5 a 3.5 cm. La textura era algodonosa a “polvorienta”, de coloración blanquecina a amarillenta-cremosa conforme envejecía y rojizo a pálido-amarillento (del centro hacía la orilla) en el envés de la caja (Figura 26).

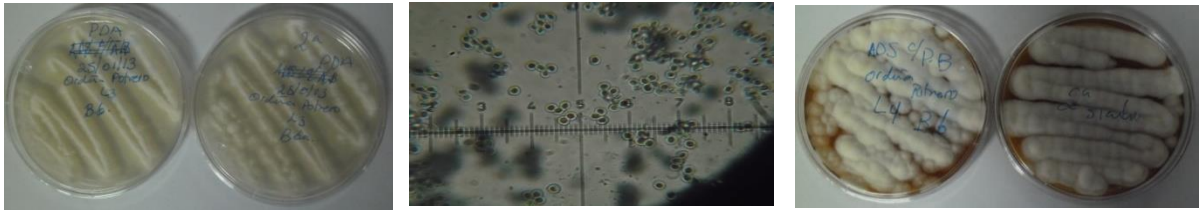


Figura 26. Colonias de *Beauveria bassiana* creciendo en medios de cultivo.

7.5.2. Morfología de *Metarhizium anisopliae*

En el caso de *M. anisopliae*, las conidias presentaron una forma cilíndrica alargada con tamaños promedio de 5 a 8.3 μm de largo por 1.9 a 3.0 μm de ancho. Se presentaron agrupándose en cadenas, hialinas, de coloración verdosa con ligera variación en sus matices y con extremos redondeados. Las hifas fueron lisas y septadas y los conidióforos cilíndricos en grupos con tamaños desde los cinco a 14 μm de longitud y de 2 a 2.5 μm de diámetro.

El crecimiento de las colonias ocurrió pegado al medio de cultivo, mostró un crecimiento homogéneo redondo, de color verdoso con diferentes matices que fueron del amarillento hasta el oscuro. En diez días, el diámetro de la colonia fue desde los cuatro cm hasta cubrir el total de la caja (Figura 27). En el fondo de la caja, la coloración era verdosa a marrón. Es importante mencionar que al inicio en el análisis morfológico, la cepa PIV01 se incluyó dentro del género *Metarhizium* por las similitudes en su morfología y características.



Figura 27. Colonias de *Metarhizium anisopliae* creciendo en medios de cultivo.

7.5.3. Morfología de *Paecilomyces* sp.

Las conidias de estos hongos presentaron una forma cilíndrica a fusiforme, formando pequeñas cadenas y con extremos redondeados. Las hifas se veían lisas, los conidióforos erectos con verticilios ramificados en grupos de 4-6 fialides. Las esporas presentaron un tamaño de 3.95 μ de largo y 1.39 μ de ancho en promedio. Las colonias alcanzaron un diámetro de 3.8 cm en una semana, de superficie vellosa-aterciopelada, de coloración verdosa. Se alcanzó a observar un pequeño exudado en una cepa de color amarillento.

7.6. Identificación molecular de los HE aislados de las UPB

Con el análisis de secuenciación del ADN se corroboró que las cepas de HE *Metarhizium* y *Beauveria* correspondían a los mismos géneros identificados en la evaluación morfológica. Se pudo identificar correctamente la cepa del hongo *Purpureocillium lilacinum*, con la cual se tenía duda al análisis morfológico. Cabe mencionar que los HE identificados como *Paecilomyces* no se identificaron molecularmente por la poca seguridad que se tenía de su género al análisis morfológico.

7.7. Análisis filogenético de los HE aislados de las UPB

7.7.1. Análisis filogenético de *Beauveria bassiana*

En este estudio se encontró que las seis cepas de *B. bassiana* se agrupan en el mismo clado con otros HE del mismo género y especie (previamente reportadas en el GenBank). Pero cuando se utilizó el método del vecino cercano (neighbor joining method) para construir el árbol filogenético, se separan en tres sub-clados diferentes (dos aislados en cada uno) (Figura 28). Este estudio reveló cierta distancia genética entre los miembros del grupo de aislados de *B. bassiana* y, probablemente, tres linajes filogenéticos diferentes.

Figura 28. Árbol filogenético de HE *Beauveria bassiana* obtenidos de suelos de UPB donde se observa su interrelación con otros *B. bassiana* aisladas en el mundo.

Seis hongos *Beauveria* de diferentes especies fueron incluidos para delimitar la especie *bassiana*.

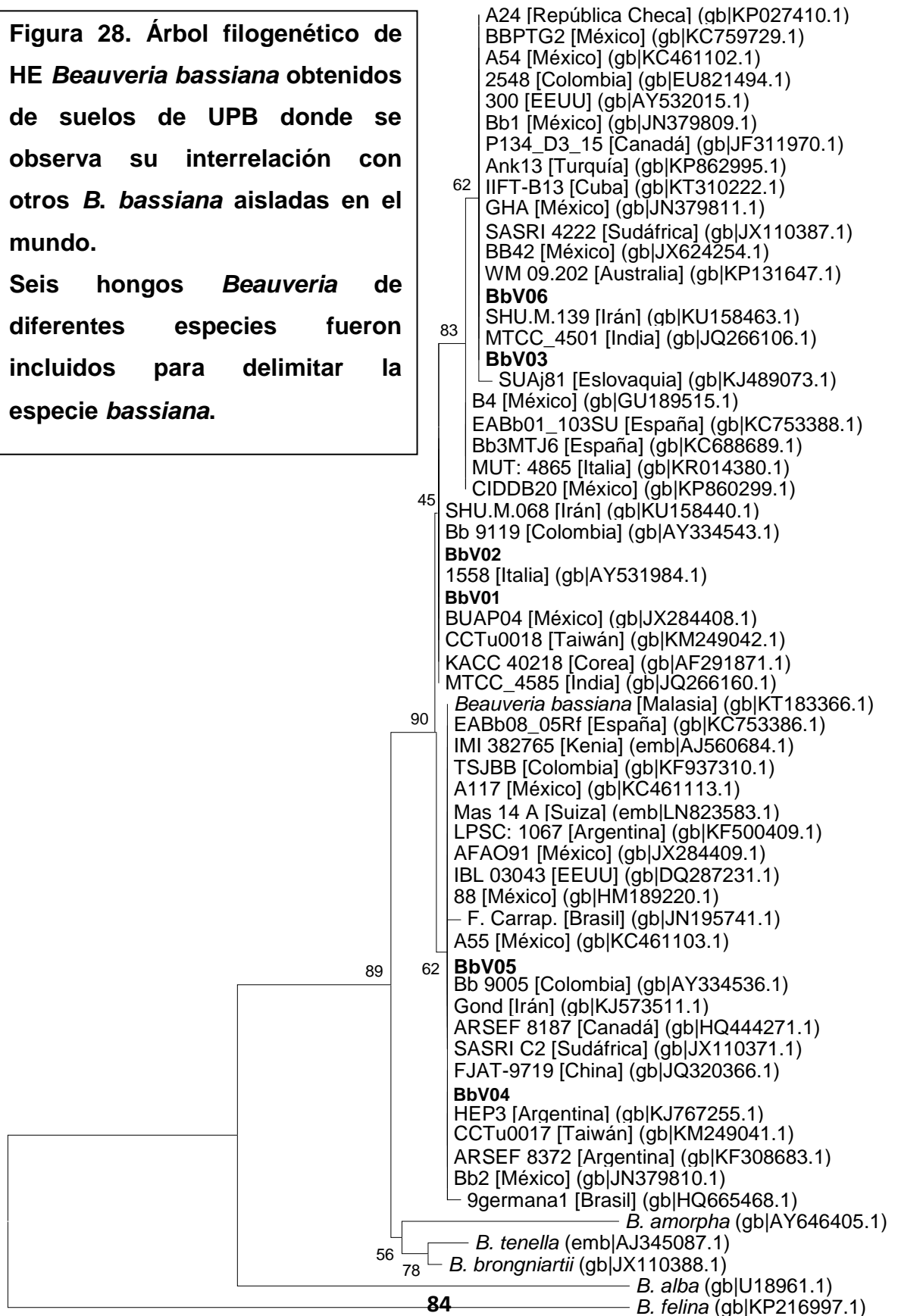
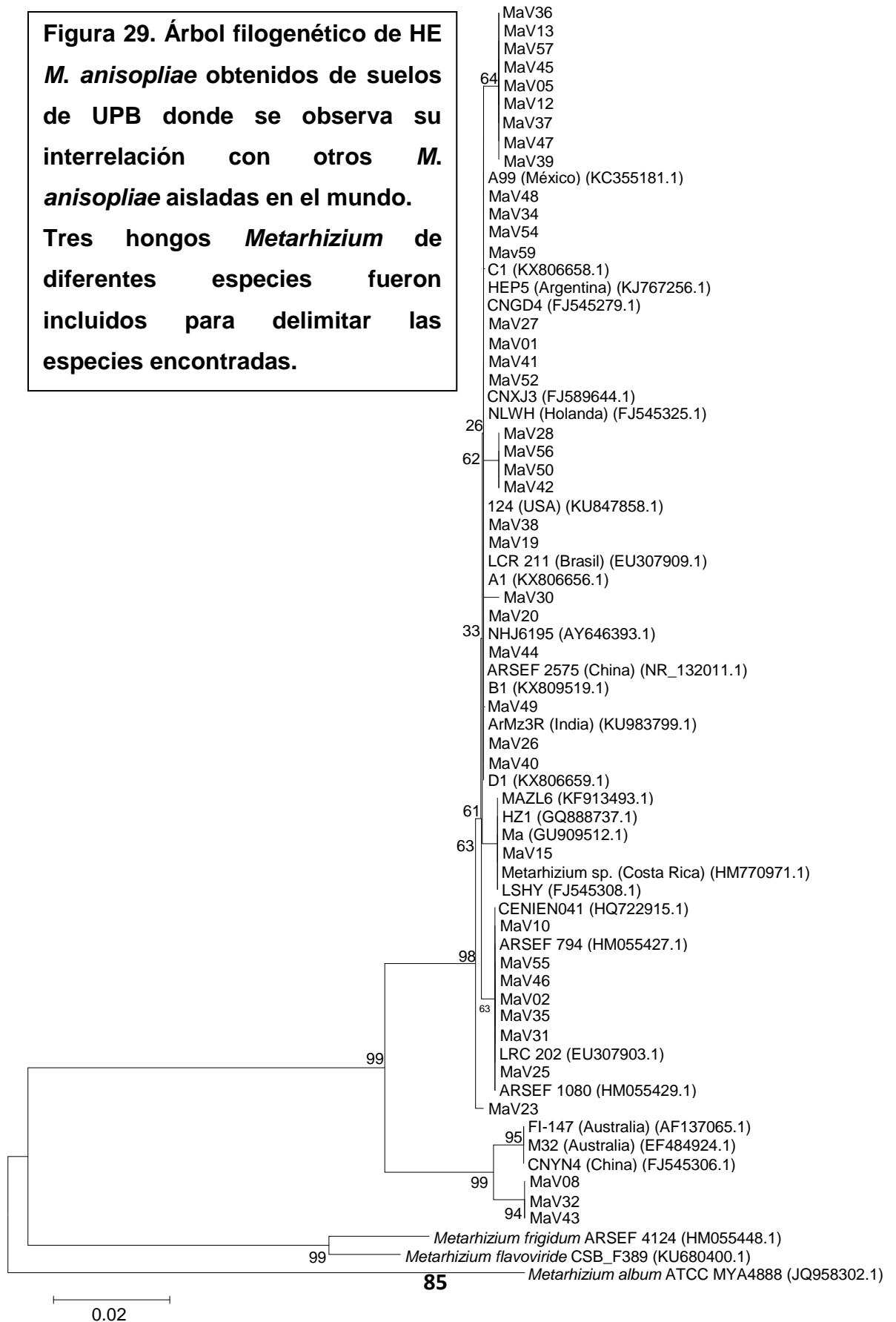


Figura 29. Árbol filogenético de HE *M. anisopliae* obtenidos de suelos de UPB donde se observa su interrelación con otros *M. anisopliae* aisladas en el mundo. Tres hongos *Metarhizium* de diferentes especies fueron incluidos para delimitar las especies encontradas.



7.7.2. Análisis filogenético de *Metarhizium anisopliae*

Las cepas de *M. anisopliae* se distribuyeron en nueve subclados en el árbol filogenético construido utilizando el método del vecino cercano (neighbor joining method) (Figura 29), aunque todas se agruparon en el grupo de *M. anisopliae*. MaV05, 08, 12, 13, 23, 30, 32, 36, 37, 38, 39, 43, 45, 47 y 57 no alinearon de manera estrecha con alguna cepa de referencia utilizada (previamente reportada en GenBank), pero se mantuvieron dentro de la filogenia de este género. El estudio reveló cierta distancia filogenética entre los miembros del grupo y, probablemente, nueve linajes filogenéticos diferentes. Esto indica que en los suelos de las UPB de Veracruz existe una complejidad genética entre las especies de *M. anisopliae*.

7.8. Efecto garrapaticida de los HE sobre teleóginas de *R. microplus*, sobre su reproducción, cálculo de las concentraciones letales 50 y 99% y diferencias en la respuesta de las garrapatas resistentes y susceptibles a los HE.

Los resultados de mortalidad de los HE *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre teleóginas de *R. microplus* resistentes o susceptibles, sobre su reproducción y las CL₅₀ y CL₉₉ se presentan en forma de artículos científicos a continuación.

7.9. Efecto garrapaticida de los HE sobre larvas de *R. microplus* resistentes o susceptibles

Los resultados de mortalidad de los HE *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre larvas de *R. microplus* resistentes o susceptibles se presentan en el cuadro 8. Nueve cepas de *M. anisopliae* mostraron un porcentaje de mortalidad alto sobre larvas de *R. microplus* sobre ambas poblaciones (79.8% - 100%). De estas, cuatro superaron el 90% de mortalidad. Ninguna cepa de *Beauveria bassiana* mostró elevados porcentajes de mortalidad sobre larvas de *R. microplus*, solo la cepa BbV03 mostró mortalidad de 41.8% y 53.2% sobre resistentes y susceptibles, respectivamente (Cuadro 8).

7.10. Diferencia en el efecto de mortalidad de los HE sobre dos poblaciones de larvas de *R. microplus*; resistentes y susceptibles

La diferencia entre las mortalidades de una población de larvas de *R. microplus* resistente a químicos acaricidas y una susceptible expuestas a los hongos *M. anisopliae* y *B. bassiana* se presentan en el cuadro 9. Veintidós grupos (resistentes vs susceptibles) de larvas expuestas a diferentes cepas de HE presentaron diferencias significativas en la mortalidad ($P < 0.05$). De estos, se encontró que en doce grupos de larvas, las susceptibles fueron más sensibles al efecto de los HE y en diez, las resistentes mostraron más susceptibles por los HE (Cuadro 9). Sin embargo, estadísticamente, no existe un efecto del estado de resistencia o susceptibilidad en la respuesta a los hongos entomopatógenos ($P > 0.05$).

Cuadro 8. Mortalidad de larvas de *Rhipicephalus microplus* resistentes (R) y susceptibles (S) a los acaricidas expuestas a *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (1×10^8 conidia/ml) durante 20 días.

Cepas	Mortalidad (%)																	
	4		6		8		10		12		14		16		18		20	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
Control	0	0	0.3	0	1.2	0	2.0	0	2.0	2.5	2.4	2.8	2.4	4.3	3.0	4.3	3.0	4.7
MaV01	0	0	0	0	2.9	0	10.4	6.7	19.0	20.5	35.0	33.3	47.7	45.3	53.5	49.4	62.7	59.4
MaV02	0	0	0	2.6	8.4	10.0	19.5	25.4	32.2	28.4	40.3	33.4	64.6	59.2	78.1	74.9	88.5	92.4
MaV03	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5	1.9	2.5	5.4	6.6	10.3	10.6	15.7	13.8	20.1
MaV04	0	0	1.4	2.0	3.6	5.2	11.1	13.7	21.0	25.5	29.4	33.7	44.0	42.6	52.3	46.6	59.4	56.5
MaV05	0	0	0	6.2	20.1	17.7	30.3	22.6	38.7	44.5	46.2	50.1	54.7	61.0	62.5	70.1	72.2	70.7
MaV06	0	0.6	2.5	1.4	6.0	7.9	14.7	15.6	32.7	30.0	49.8	45.4	71.4	65.3	88.6	72.2	97.3	89.3
MaV07	0.8	0	2.8	1.3	7.0	5.0	15.2	14.1	22.3	19.3	27.8	22.9	33.3	25.5	39.1	36.0	43.6	42.2
MaV08	0	0	0	1.6	13.0	12.4	22.2	26.8	31.5	33.9	53.2	48.7	61.4	59.4	70.0	71.6	79.8	83.1
MaV09	0.8	0	2.8	1.3	3.9	3.6	4.5	11.0	13.3	16.6	16.7	20.4	33.4	25.5	39.1	35.9	43.6	42.2
MaV10	0	0	0	0	2.2	2.7	7.4	9.7	14.2	15.5	20.7	29.8	31.9	37.3	49.9	50.6	59.1	62.2
MaV11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.6	1.8	3.5	4.3	11.0	15.3	19.0

MaV12	0	0	0	1.7	4.4	3.9	14.2	15.7	25.7	22.4	50.0	36.6	56.2	43.9	63.4	50.2	70.5	64.2
MaV13	0	0	0.5	0	1.6	7.4	14.7	9.7	27.4	19.6	34.3	40.0	52.1	57.8	61.2	66.6	70.8	81.2
MaV14	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	3.9	6.2	9.6	13.4	18.0	24.7	20.1	36.2	33.3
MaV15	0	0	0	0	0	0	0.2	1.9	2.8	5.1	7.7	13.6	16.5	22.2	30.8	36.2	46.4	50.4
MaV19	0	0	0.3	0	1.7	0	4.4	0.7	9.1	5.8	14.0	13.8	20.0	15.2	26.7	17.3	32.4	29.8
MaV20	0	0	0	0	10.0	6.3	28.6	16.7	37.3	31.2	53.2	40.5	69.2	65.4	76.8	82.1	94.4	91.3
MaV21	0	0	6.2	7.0	17.0	13.2	24.4	20.9	32.1	25.3	40.0	27.8	53.7	31.0	66.6	43.2	70.3	56.5
MaV22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0.2	2.1	0.7	3.6	2.2
MaV23	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	1.6	0.4	4.5	2.7	10.0	5.2	14.1	9.4
MaV25	0	0	0	0	3.8	0	9.9	6.2	16.4	15.4	21.5	26.0	31.8	32.5	37.4	46.7	41.9	50.3
MaV26	0	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0	1.1	0.7	3.3	1.6	4.0	4.7	11.8	13.6
MaV27	0	0	0.4	0	1.9	0	2.7	0.3	5.1	2.8	9.1	6.2	17.0	14.5	22.9	22.6	32.1	30.2
MaV28	0	0	0	0	0.9	0	6.6	8.0	16.0	23.1	22.2	29.3	31.6	40.0	33.7	45.5	39.3	51.7
MaV29	0.9	0	10	2.0	25.0	19.1	53.3	57.7	62.2	60.1	72.0	69.9	77.4	82.1	83.9	90.2	92.3	94.9
MaV30	0	0	0	0	4.3	5.6	17.7	12.3	26.3	30.0	42.2	41.3	52.9	46.0	68.0	52.2	72.5	73.1
MaV31	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	1.1	3.3	4.7	6.0	13.1	13.2	20.0	22.0	27.3
MaV32	0	0	1.0	0	2.1	0.9	6.2	4.2	11.0	8.8	22.2	15.7	31.1	22.2	34.2	29.3	35.9	40.2

Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.3	0.9	1.1	3.3	2.3	6.0	4.09	6.2
MaV33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.4	0.7	1.2	1.3	1.6	1.7	2.0
MaV34	0	0	0.8	0	3.0	2.2	15.2	13.2	31.1	20.0	51.1	26.0	60.0	45.7	67.2	54.0	70.2	62.9
MaV35	0	0	0	0	1.0	0	3.0	0	5.7	0	9.3	0	8.0	2.2	10.81	5.3	20.1	13.4
MaV36	0	0.8	1.6	3.3	15.4	12.8	31.0	25.0	41.3	40.0	45.3	47.9	50.0	53.1	62.3	70.0	74.6	71.1
MaV37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0.3	1.6	0.9	2.9	4.1	5.6
MaV38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.9	5.0	7.3	12.2	12.9	16.3	31.5	28.3
MaV39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10.0	4.0	12.2	6.7	17.3	7.84	20.0	22.6	28.8
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.0	2.2	3.4	6.4
MaV40	0	0	2.2	1.0	12.7	5.0	40.0	17.5	48.3	27.2	52.1	30.1	67.6	33.9	81.2	67.3	83.9	73.9
MaV41	0	0	0	0	2.7	0	9.0	6.2	12.2	12.2	16.6	17.9	33.3	61.2	38.2	75.3	50.0	77.7
MaV42	1.0	0.9	4.2	6.0	13.8	11.1	20.6	17.0	47.0	30.0	50.0	32.1	77.7	47.7	85.2	60.0	89.6	70.0
MaV43	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0	0.9	2.3	2.1	4.2	6.6	12.2	13.0	13.2	17.9
MaV44	2.2	0	4.1	0	13.0	0	16.2	6.8	27.3	13.0	43.9	27.2	50.9	35.6	62.2	43.0	67.5	50.0
MaV45	0	0	12.0	5.2	17.2	11.3	29.2	32.2	53.7	51.0	63.9	60.0	72.1	73.3	80.1	82.2	91.6	90.1
MaV46	1.9	2.1	8.9	7.2	19.2	11.2	30.0	25.0	42.2	35.4	62.3	43.5	72.7	57.2	83.5	79.2	88.2	84.4
MaV47	0	0	1.0	2.2	3.0	3.7	9.0	17.9	20.2	31.0	33.3	35.1	40.8	47.7	55.3	63.2	71.7	77.1

MaV48	0	0	0	0	5.0	4.7	13.2	12.5	30.3	29.2	41.2	43.3	47.1	50.0	52.6	54.4	67.3	66.4
MaV49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.9	2.0	3.65	3.5	13.2	4.2
MaV50	2.1	10.0	13.3	25.0	29.2	46.9	54.4	68.3	70.0	70.0	77.3	80.0	81.7	87.6	90.0	91.5	96.3	100
MaV51	0	0	0	0	0.7	0	1.7	0	3.7	2.0	8.8	4.4	12.2	9.1	17.2	13.9	21.6	16.6
MaV52	0	0	0	0	0	0	3.0	3.1	12.0	9.0	16.1	11.3	22.7	20.0	27.1	25.3	32.4	33.4
MaV53	0	0	0	0	0	0	1.7	0	2.3	0.7	5.2	3.7	7.3	5.6	9.1	8.8	10.0	9.3
MaV54	3.0	1.1	12.0	9.7	25.2	16.0	32.1	40.0	46.3	51.2	60.3	58.8	66.3	70.0	73.5	81.3	85.0	85.9
MaV55	0	0	0	0	4.7	4.3	14.2	11.0	20.0	16.2	40.0	27.8	43.6	33.7	51.0	40.0	55.3	47.2
MaV56	0	0	0	0	0	0	0	2.2	3.1	6.6	7.2	15.3	13.1	17.2	22.3	25.0	27.7	33.5
MaV57	0	0	0	0	0	2.0	0	3.2	1.6	5.2	3.1	9.7	11.1	12.2	20.0	20.8	28.9	33.2
MaV58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.1	6.2	10.0	9.0	11.3
MaV59	0	0	0	0	0	0	1.0	0	2.9	0	5.1	0	7.3	0	10.5	0	12.6	2.0
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0.6	1.7	2.6	2.5	3.1	3.5	4.0
BbV01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.1	2.0	3.7	5.1	4.2	6.7	6.4	8.5
BbV02	0	0	0	0	0	0	0	1.1	5.3	3.0	7.1	6.0	8.2	9.2	14.0	14.3	15.4	16.7
BbV03	0	0	0	0	1.7	0.9	3.7	9.2	6.2	13.8	10.0	17.7	16.2	25.0	22.3	31.8	41.8	53.2
BbV04	0	0	2.0	0	4.2	0	6.8	3.4	17.5	9.0	20.0	13.3	26.9	15.5	31.0	19.0	38.8	31.5

BbV05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.2	3.0	5.8	10.0	8.3	12.4	9.6
BbV06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0	1.1	4.2	3.0	5.7	3.2

Cuadro 9. Efecto de mortalidad de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre larvas de *R. microplus* resistentes y susceptibles a los acaricidas químicos.

Mortalidad de larvas al día 20

Cepa	Larvas resistentes	Larvas susceptibles	Valor P	Más afectada
MaV01	62.7	59.4	0.4474	Sin diferencia
MaV02	88.5	92.4	0.5322	Sin diferencia
MaV03	13.8	20.1	0.0496	Susceptibles
MaV04	59.4	56.5	0.6471	Sin diferencia
MaV05	72.2	70.7	0.9167	Sin diferencia
MaV06	97.3	89.3	0.1336	Sin diferencia
MaV07	43.6	42.2	0.8004	Sin diferencia
MaV08	79.8	83.1	0.1452	Sin diferencia
MaV09	43.6	42.2	0.8726	Sin diferencia
MaV10	59.1	62.2	0.0408	Susceptibles
MaV11	15.3	19.0	0.7373	Sin diferencia
MaV12	70.5	64.2	0.7054	Sin diferencia
MaV13	70.8	81.2	0.5854	Sin diferencia
MaV14	36.2	33.3	0.8025	Sin diferencia
MaV15	46.4	50.4	0.8521	Sin diferencia
MaV19	32.4	29.8	0.8632	Sin diferencia
MaV20	94.4	91.3	0.4964	Sin diferencia
MaV21	70.3	56.5	0.3789	Sin diferencia
MaV22	3.6	2.2	0.1815	Sin diferencia
MaV23	14.1	9.4	0.2183	Sin diferencia

MaV25	41.9	50.3	0.2121	Sin diferencia
MaV26	11.8	13.6	0.4288	Sin diferencia
MaV27	32.1	30.2	0.6573	Sin diferencia
MaV28	39.3	51.7	0.0084	Susceptibles
MaV29	92.3	94.9	0.3768	Sin diferencia
MaV30	72.5	73.1	0.9413	Sin diferencia
MaV31	22.0	27.3	0.1787	Sin diferencia
MaV32	35.9	40.2	0.4577	Sin diferencia
MaV33	1.7	2.0	0.2298	Sin diferencia
MaV34	70.2	62.9	0.0729	Sin diferencia
MaV35	20.1	13.4	0.0115	Resistentes
MaV36	74.6	71.1	0.218	Sin diferencia
MaV37	4.1	5.6	0.1049	Sin diferencia
MaV38	31.5	28.3	0.1873	Sin diferencia
MaV39	22.6	28.8	0.0008	Susceptibles
MaV40	83.9	73.9	0.1492	Sin diferencia
MaV41	50.0	77.7	0.0001	Susceptibles
MaV42	89.6	70.0	0.0012	Resistentes
MaV43	13.2	17.9	0.0465	Susceptibles
MaV44	67.5	50.0	0.0016	Resistentes
MaV45	91.6	90.1	0.7184	Sin diferencia
MaV46	88.2	84.4	0.3347	Sin diferencia
MaV47	71.7	77.1	0.0064	Susceptibles
MaV48	67.3	66.4	0.478	Sin diferencia
MaV49	13.2	4.2	0.0002	Resistentes

MaV50	96.3	100	0.0004	Susceptibles
MaV51	21.6	16.6	0.0007	Resistentes
MaV52	32.4	33.4	0.5148	Sin diferencia
MaV53	10.0	9.3	0.4984	Sin diferencia
MaV54	85.0	85.9	0.5155	Sin diferencia
MaV55	55.3	47.2	0.0089	Resistentes
MaV56	27.7	33.5	0.0123	Susceptibles
MaV57	28.9	33.2	0.0257	Susceptibles
MaV58	9.0	11.3	0.042	Susceptibles
MaV59	12.6	2.0	0.00005	Resistentes
BbV01	6.4	8.5	0.0957	Sin diferencia
BbV02	15.4	16.7	0.2205	Sin diferencia
BbV03	41.8	53.2	0.0177	Susceptibles
BbV04	38.8	31.5	0.0046	Resistentes
BbV05	12.4	9.6	0.0497	Resistentes
BbV06	5.7	3.2	0.0073	Resistentes

VIII. DISCUSIÓN

8.1 Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelos de unidades de producción bovina en el trópico

Los HE de los géneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces* y *Lecanicillium* pueden ser utilizados en el control biológico de las garrapatas. A pesar de que la presencia de cada género puede ocurrir en diferentes hábitats, la mayoría de los estudios coinciden en que su mayor presencia es en los suelos (saprófitos). En este estudio, se aislaron 68 cepas de HE de suelos destinados al pastoreo de bovinos, siendo la especie *Metarhizium* la más prevalente, seguida por *Beauveria* y *Paecilomyces* y solo una de *Purpureocillium lilacinum*. Este hallazgo es similar a lo reportado por Sun et al. (2008) en suelos de cultivo y Bruck (2004) en suelos de viveros, quienes mencionan que *M. anisopliae* es el HE más común, seguido por *B. bassiana* y *Paecilomyces spp.* D'Alessandro et al. (2012) mencionan que *M. anisopliae* junto con *P. lilacinum* fueron los únicos HE aislados en muestras de suelos de pastizales altamente infestados por garrapatas *Amblyomma cajennense*. Por otro lado, Asensio et al. (2003) en suelos agrícolas, bosques y matorrales así como Hernández-Velázquez et al. (2011) en suelos de cultivo de maíz, mencionan que *B. bassiana* es el hongo con más presencia, seguido por *M. anisopliae* y *L. lecanii* o *Paecilomyces sp.* Algunos factores como la región, el uso de los suelos y la época del año, pueden influir sobre la prevalencia y el aislamiento de los HE. En este estudio, los HE *Metarhizium sp* y *Beauveria sp* tuvieron mayor presencia en los suelos de las UPB. Esto puede ser explicado por la alta gama de hospederos y sustratos que *Metarhizium* y *Beauveria* pueden utilizar para su reproducción y, así, favorecer su sobrevivencia y distribución. Los suelos usados en este estudio provienen de ecosistemas con alta cantidad de insectos, garrapatas y materia orgánica, lo cual favorece la disponibilidad de nutrientes para los HE (INEGI, 2008).

Otro factor que pudo influir sobre la mayor presencia *M. anisopliae* en los suelos de las UPB, es la capacidad de este hongo de desarrollarse mejor a

temperaturas altas y a una mayor humedad (Hernández-Velázquez et al., 2011), características que predominan en la región de estudio. Comparativamente, *M. anisopliae* se adapta mejor que *B. bassiana* a 25 - 30° C de T y 100 % de HR (Vannien, 1996). Además, la amplia variedad de sub-especies y variedades de *M. anisopliae* aumentan la presencia y adaptación de este hongo a diversos ecosistemas, incluyendo los tropicales.

Los HE necesitan características ambientales adecuadas del hábitat donde se desarrollan. Los requerimientos de cada género, especie o variedad son diferentes y de esto depende su presencia, ausencia, riqueza y distribución. En el presente estudio, *M. anisopliae* se encontró con mayor frecuencia en los corrales donde se manejan los bovinos; mientras que *B. bassiana* en los cercos vivos, que asu vez fue la zona donde se aislaron los cuatro géneros de HE reportados. Asencio et al. (2003) mencionan que *B. bassiana* se presenta con mayor frecuencia en bosques y matorrales. Quesada-Moraga et al. (2007) mencionan que la ocurrencia para cada género de HE está influenciada tanto por la especie del hongo y el tipo de hábitat; y que en particular *B. bassiana* se presenta con mayor intensidad en suelos de hábitats naturales (sin actividad agrícola o pecuaria), y *M. anisopliae* en suelos cultivables (Sun et al., 2008)]. Lo anterior puede ayudar a explicar los resultados reportados en este estudio, donde en los suelos de las UPB que tienen una actividad pecuaria elevada, hubo una mayor presencia de *M. anisopliae*. Mientras que los suelos en los cercos vivos fueron propicios para el desarrollo de *Beauveria*; es probable que además de la nula actividad pecuaria en los suelos del cerco vivo, hubo otros factores como una mayor humedad (90%) y sombra, sustratos como materia orgánica y amplia variedad de insectos y arácnidos que favorecen la mayor presencia de *B. bassiana*. Estas mismas causas propician la mayor riqueza de HE, razón por la cual los cuatro géneros reportados se aislaron en estas zonas.

En cuanto a la región, la mayor cantidad de HE se aislaron de áreas plano-montañas y en menor proporción en la zona costera. Este hallazgo se puede explicar debido a las diferencias en las características nutricionales de los suelos,

tales como los componentes químicos, materia orgánica y pH (Garrido-Jurado et al., 2011). La sobrevivencia de HE está influenciada por diversos factores como las propiedades físico-químicas de los suelos, hidrofobicidad de los sustratos y las interacciones electrostáticas (Wollum y Cassel, 1978; Storey y Gardner, 1987). Los suelos de las regiones costeras tienden a ser arenosos, y las condiciones para la sobrevivencia de las conidias de HE tienden a disminuir debido a una menor retención de conidias en ese tipo de suelos, sobre todo para *B. bassiana* (Garrido-Jurado et al., 2011). Además, la alta salinidad en suelos (como en las regiones costeras) es un factor relacionado con la baja abundancia y baja diversidad relativa de los microorganismos (Arenz y Blanchette, 2011). Al respecto, Quesada-Moraga et al. (2007) mencionan que suelos arenosos alcalinos provocan ausencia de los HE, incluyendo los más importantes. En contraparte, en las regiones plano-montañas las condiciones ambientales y de sombra, humedad de suelos, materia orgánica y nutrición de los suelos tiende a ser óptimos para el crecimiento de los HE (Jarillo-Rodríguez, comunicación personal). En los siguientes párrafos se discutirá el efecto de los componentes nutricionales de los suelos sobre la ausencia/presencia de HE y se visualizará desde ese enfoque el efecto de las regiones en los aislamientos.

8.2. Análisis físico-químicos de los suelos de las UPB

La mayoría de los suelos muestreados en este estudio, tuvieron niveles bajos de N, P, Fe y Zn. La falta de estos minerales se ha relacionado con la diversidad / abundancia de microorganismos. La carencia de N afecta el crecimiento de microorganismos debido a que forma parte fundamental de todas sus biomoléculas (Basauere, 2006). El P es un macronutriente esencial para microorganismos debido a que forma parte de sus ácidos nucleicos, ATP, fosfolípidos y polímeros de la pared celular (Mateos, 2004). La deficiencia de magnesio y potasio provoca suelos ácidos y, caso contrario, el aumento de Ca propicia suelos alcalinos (Ritchey et al., 1982), los cuales pueden ser positivos nutricionalmente en el desarrollo de los HE (Garrido-Jurado et al., 2011). Esta

información, coincide con lo encontrado en el presente estudio, ya que estos componentes se presentan en cantidades altas en los suelos muestreados y éstos mismos suelos presentaron un pH de neutro a alcalino en su mayoría (71.5%). El Fe, Cu y Zn son componentes importantes ya que actúan en el metabolismo de microorganismos (Basaure, 2006). A pesar de que los suelos presentaron estas carencias mencionadas, solo la cantidad de materia orgánica (alta) fue una variable que influyó significativamente en la ausencia/presencia de HE en los suelos ganaderos ($P < 0.05$). Esto resalta la importancia de la MO en la presencia de microorganismos en suelos, ya que como se sabe, a partir de ésta se producen sustancias orgánicas, libera nutrientes, protege los suelos, tiene efecto en la acidez del suelo e influye en los regímenes hídricos y térmicos de los mismos (Molina et al., 2000). Como lo mencionan Arenz et al., 2010, la baja abundancia de microorganismos y su diversidad, dependen de la T, la humedad y, en gran medida, de la disponibilidad de MO. La baja prevalencia de hongos *B. bassiana* en los suelos, a diferencia de *M. anisopliae*, puede deberse, también, a las altas concentraciones de calcio en los suelos. Como lo describen Garrido-Jurado et al. (2011) en su estudio, que a mayor concentración de CaCl_2 , la concentración de conidias de *B. bassiana* tiende a disminuir en poco tiempo.

8.3. Factores geoclimáticos y de manejo de suelos como causas de ausencia/presencia de HE

En el presente estudio, la altitud y el uso de herbicidas se asociaron con la ausencia de HE. Aunque los HE son cosmopolitas y básicamente se ha reportado su presencia en todas latitudes (Augustyniuk-Kram y Kram, 2012), la altura puede jugar un papel determinante en la supervivencia, presencia y riqueza de los HE debido a diversos factores. En las zonas tropicales, a menor altura, las temperaturas tienden a ser superiores a las que prevalecen en las zonas más altas. En este estudio se encontró mayor presencia de HE conforme los aislamientos se realizaban en zonas con mayor altura. Se ha reportado que el frío o el calor ambiental son dos factores abióticos muy importantes en la permanencia

y desarrollo de la mayoría de los HE (Fernandes et al., 2008). Además, en la región, la estructura de los suelos tiende a ser diferente en las zonas bajas en comparación con las zonas altas. Este otro factor puede influir sobre la mayor presencia de HE en zonas con mayor altitud. En las zonas más bajas y más arenosas, la red de poros del suelo tiende a ser menos densa, por lo tanto, los componentes nutricionales son menores. Esto implica que los patrones de obtención de nutrientes para los HE es más extenso, provocando una mayor necesidad de energía (Ritz y Young, 2004) y disminuyendo, de cierta forma, su sobrevivencia. Caso contrario, a mayor densidad de la red de poros pequeños en el suelo, los microbios tienden a establecerse mejor (Harris et al., 2003). Esta misma característica tiene que ver con la distribución de agua, necesaria para la sobrevivencia de los HE, donde una densidad mayor en la red de poros permitiría mejor retención de agua, por ende una mayor humedad y, así, mejores oportunidades de sobrevivencia para estos organismos del suelo (Ritz y Young, 2004). Al respecto, y coincidiendo con este trabajo, Wakil et al. (2014) mencionan que la altitud puede influenciar la ocurrencia de HE en insectos y reporta que en su estudio se aislaron más cepas de HE a partir de 400 msnm de altura, y que a menor altitud los aislados tienden a disminuir. De la misma manera, Samson et al. (1987) refuerzan nuestros resultados al reportar que hongos como los entomophthorales demuestran mayor presencia en poblaciones de insectos forestales en países tropicales, pero, principalmente en los hábitats de mayor altitud con climas subtropicales a templados. Quesada-Moraga et al. (2007) sugieren un rango de altitud de 400 a 700 msnm óptimo para el crecimiento y la diversidad de los HE. Existen autores que mencionan que hasta los 1608 msnm en condiciones tropicales, hay condiciones favorables para los HE, y estos se ven afectados a altitudes superiores a 5200 msnm (Sun y Liu, 2008).

En cuanto al uso de agroquímicos, se conoce que la aplicación regular de herbicidas puede causar cambios en los componentes biológicos de los hábitats, a través de la alteración de ciertas uniones en la cadena de las inter-relaciones biocenóticas (Poprawski y Majchrowicz, 1995). Los enemigos naturales de plagas

han mostrado ser sensibles a los pesticidas químicos en general (Havron et al., 1987). En un estudio realizado por Poprawski y Majchrowicz (1995), se demostró que los agroquímicos tiene efectos fungicidas y fungistáticos sobre HE como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus* y *Verticillium lecanii*. El crecimiento radial y la germinación de esporas también son factores afectados por los agroquímicos. Casely et al. (1991) demostraron que los herbicidas inhiben a varios hongos (fitopatógenos); mientras que Harrison y Gardner (1992) señalaron un efecto fungistático sobre *Beauveria bassiana*. Recientemente Clifton et al. (2015) mencionaron que no encontró algún efecto de toxicidad de los herbicidas sobre los HE, pero que si reportaron ambientes más favorables y mejores para el desarrollo de los hongos en zonas donde no se usan químicos. Estos estudios previamente reportados, concuerdan con lo hallado en este estudio, visualizando que el problema principal es la disminución de las poblaciones de HE durante el proceso de infección de plagas. Aunque los herbicidas juegan un papel fundamental en el control de malezas dañinas para los pastizales, es importante conocer a nivel de campo los efectos secundarios sobre la biodiversidad, sobretudo en insectos benéficos y enemigos naturales de plagas. Estudios de aplicaciones programadas, microorganismos tolerantes o compatibles y herbicidas menos nocivos para estos, serían necesarios para mantener o mejorar el sinergismo entre ambos componentes de control (Poprawski y Majchrowicz, 1995).

8.4. Identificación morfológica y molecular de los HE y su relación filogenética.

La identificación morfológica y molecular de los HE puede ayudar a diferenciar entre hongos patógenos y no patógenos para mamíferos, a determinar características de reproducción o requerimientos de temperatura y humedad, así como a predecir perfiles o mecanismos de virulencia en contra de organismos plaga (Meyling and Eilenberg, 2007; Bischoff et al., 2009; Rehner et al., 2011). También se ha demostrado que algunos hábitats pueden albergar diferentes

especies de HE y diferentes grupos genéticos dentro de estas especies (Meyling et al., 2009, Ormond et al., 2010). Por lo general, la identificación de los HE se realiza con base en las características morfológicas y de cultivo; sin embargo, esto podría no ser suficiente para una completa diferenciación entre especies del mismo género (Pérez-González et al., 2014). Es necesario el uso de métodos más confiables y sensibles como las técnicas moleculares para asegurar la diferenciación de HE candidatos a ser utilizados como control biológico de garrapatas. Las características morfológicas y de cultivo de los HE encontradas en este estudio coinciden con aquellas reportadas por otros autores (Alves, 1998; Humbert, 1997; Cañedo y Ames, 2004). Aunque se sabe que, normalmente, los límites entre las especies de los géneros de HE se basan en estudios morfológicos, el análisis genético es necesario para delimitar claramente la relación entre estas (Neelapu et al., 2009).

Respecto a las relaciones filogenéticas por separado entre los géneros y, para el caso de *B. bassiana*, éstas se separaron en tres subgrupos diferentes. El estudio reveló que existe alguna distancia genética entre los miembros de los aislados de *B. bassiana* y se observaron tres posibles linajes filogenéticos. Esto indica que en los suelos de las UPB existe una probable complejidad genética dentro de las especies de hongos *B. bassiana*. Neelapu et al. (2009) demostraron que el complejo de *B. bassiana* varía ampliamente en diferentes linajes y muestran una clara separación filogenética. Probablemente en el presente estudio se encontraron tres diferentes subespecies de *B. bassiana*, lamentablemente la diferenciación a nivel de subespecie no fue posible de acuerdo con la técnica molecular utilizada. En el grupo de los aislados de *M. anisopliae*, las cepas de agruparon en nueve diferentes sub-clados en el árbol filogenético construido. Se determinó que existe un diversidad específica de *Metarhizium* spp. en los suelos de las UPB de Veracruz, México. Estos estudios y resultados son importantes para entender un poco más acerca de la ecología y la composición de poblaciones nativas de HE en los diversos ecosistemas (Hernández-Domínguez et al., 2016).

Nuestros resultados corroboraron lo descrito por Bischoff et al. (2009) y Kepler et al. (2014), quienes aseveran que especies encriptadas de *M. anisopliae* (y otros HE como *Beauveria* spp) no pueden ser separadas morfológicamente o mediante determinaciones taxonómicas, ya que el análisis morfológico realizado en este estudio permitió saber el género y la especie de los HE, pero no se observaron separaciones más puntuales como en el análisis filogenético. Los resultados aquí presentados son similares con lo reportado por Becerra-Velásquez et al. (2007) en Chile y Freed et al. (2011), quienes encontraron una alta variación genética entre aislados de *M. anisopliae* s. l., corroborando la existencia de especiación encriptada en las poblaciones de HE. En México Hernández-Domínguez et al. (2016) también encontraron alta variabilidad genética entre aislados de *M. anisopliae* y reportó ocho haplotipos entre 29 aislados. Los resultados del presente estudio son muy interesantes debido al hecho de que las distancias geográficas entre los aislamientos son muy inferiores a lo reportado por los investigadores mencionados, lo cual podría indicar una mayor variabilidad genética aún en grupos de HE estrechamente relacionados geográficamente. La importancia radica en que la ecología de los HE en estos ecosistemas de las UPB pueden presentar una mayor complejidad genética en comparación con otros ecosistemas reportados. El factor ambiente puede ser el motivo de esta variación, ya que la proporción de tipos nucleares en un aislado varía de acuerdo a las condiciones medio-ambientales, permitiendo, eventualmente, a cada aislado alterar su estructura nuclear en respuesta a las condiciones ambientales prevalentes (Deacon, 1997). Más complejo aún, para el caso de la variación genética en *Beauveria bassiana*, además de lo mencionado, se han reportado eventos recombinantes, tales como un intercambio de núcleos durante eventos de fusión hifal (anastomosis) que puede ser continuado por recombinación nuclear (ciclo parasexual) (Burdon y Silk, 1997), aunque este hallazgo solo ha sido encontrado en laboratorio (Castrillo et al., 2004). Son necesarios estudios aumentando el número de muestras de suelos y ampliando el territorio geográfico

en las zonas ganaderas de diferentes regiones tropicales de México para corroborar dicha variabilidad genética.

8.5. Efecto de los HE sobre la mortalidad, la reproducción de adultas de *R. microplus*.

La discusión de los resultados obtenidos en la evaluación de los HE contra teleóginas de *R. microplus*, y su reproducción, contra dos poblaciones (resistentes y susceptibles) y la obtención de las CL50 y CL99 se presentan en los artículos científicos que se presentaron en la sección 7.8 de resultados correspondientes.

8.7. Efecto de los HE sobre la mortalidad de larvas de *R. microplus*

La mortalidad causada por las cepas de *M. anisopliae* contra larvas de las dos poblaciones de garrapatas en este estudio, fueron similares a lo reportado por Ángel-Sahagún et al. (2012) y Melo et al. (2006) quienes reportaron que 15 aislados presentaron mortalidades entre 93 % y 100 %, y una cepa con mortalidades de 97 % - 99 %, respectivamente. De la misma manera, Fernandes et al. (2004) reportaron 94% de mortalidad a la misma dosis usada en el presente estudio. En general, los diversos estudios que existen reportan haber obtenido mortalidades similares a lo que se obtuvo en esta investigación (Fernandes et al., 2008). Para el caso de los hongos *B. bassiana*, los resultados de otros estudios han presentado mayor variabilidad. Por ejemplo, Bittencourt et al. (1996) y Fernandes et al. (2003 y 2006) reportaron mortalidades superiores de hasta 88 %, 96 % y 100 %, respectivamente, contra larvas de *R. microplus*. Paião et al. (2001), sin embargo, encontraron mortalidades similares al presente estudio (19.6 % - 60.7 %). Todos estos reportes de altas mortalidades con *M. anisopliae* ponen de manifiesto que este complejo fúngico es una alternativa potencial como un agente de biocontrol de garrapatas. En el caso de *B. bassiana*, es importante realizar mayores investigaciones, quizás combinando las dos mejores cepas encontradas, ya que, en general, su efecto sobre adultas y larvas fue consistente.

El efecto acaricida de los HE, evaluado mediante la mortalidad, fue menor en las larvas que en las garrapatas adultas de las dos poblaciones evaluadas en este estudio. Nueve cepas de *M. anisopliae* mostraron buen efecto acaricida (79.8 % - 100 % de mortalidad) contra las dos poblaciones de *R. microplus*. La cepa MaV50 causó la mayor mortalidad sobre larvas. La cepa MaV55, que fue la que tuvo mejores porcentajes de mortalidad contra adultas, en larvas solo causó de 47.2 % a 55.3 % de mortalidades. En el caso de *Beauveria*, solo la cepa BbV03 mostró mortalidad media contra las larvas de *R. microplus*. Las diferencias en la susceptibilidad entre estadios de las garrapatas a los HE, se ha reportado en estudios previos (Reis et al., 2001; Samish et al., 2001; Gindin et al., 2002); pero los mecanismos detrás de esta variación, no han sido totalmente dilucidados. En algunos estudios se ha informado que las larvas son más resistentes que las adultas; por ejemplo, en el tratamiento a coumaphos, la tasa de desintoxicación metabólica es más rápida en larvas que en adultas (Bull y Ahrens, 1988). Aunque también existen estudios que mencionan que las etapas jóvenes de las garrapatas sin alimentarse, son más susceptibles tanto a químicos como a HE (Gindin et al., 2002). El conocimiento de las causas de esta variación en la susceptibilidad entre estadios de garrapatas, puede tener una gran importancia en las evaluaciones en campo donde se encuentran todas las fases biológicas de las garrapatas (poblaciones heterogéneas), lo cual puede influir directamente en la respuesta acaricida de los HE en condiciones naturales (Samish et al. (2004).

8.8. Respuesta de dos poblaciones de *R. microplus* (resistente y susceptible) al efecto acaricida de los HE

Se comparó el efecto acaricida de los aislamientos de HE contra dos poblaciones de *R. microplus* (resistentes o susceptibles a acaricidas químicos). No hubo diferencias en la respuesta de las poblaciones de *R. microplus* a los hongos evaluados. Mismos resultados fueron reportados por Fernández-Ruvalcaba et al. (2005) quienes no encontraron diferencias de mortalidad entre las poblaciones de garrapatas susceptibles y resistentes tratadas con *M. anisopliae* o con *B.*

bassiana. También, Bahiense et al. (2008) no informaron mortalidad en una población resistente de *R. microplus*, utilizando el aislamiento Ma959 de *M. anisopliae*. Nuestros resultados sugieren que el o los mecanismos de resistencia usado por las garrapatas para evitar los efectos tóxicos de los acaricidas químicos (Guerrero et al., 2012), no afectaron los mecanismos infecciosos de las cepas de HE evaluadas. La forma en que los HE matan a las garrapatas es muy diversa (Morais-Urano et al., 2012; Tellez-Jurado et al., 2009), lo que sugiere que es menos probable que exista resistencia a los agentes de control biológico como HE que la que se ha reportado para acaricidas químicos (Polar et al., 2005). Esta menor probabilidad de desarrollar resistencia y el conocimiento de la virulencia de los HE, ayudará a justificar y diseñar nuevas estrategias de control de garrapatas resistentes en condiciones de campo utilizando hongos como coadyuvantes agentes de control. Como Mnyone et al. (2011) menciona, una parte importante de una estrategia de control integrado de garrapatas es que los HE podrían utilizarse para evitar controlar o evitar la aparición de niveles serios de resistencia a acaricidas.

IX. CONCLUSIONES

Nueve cepas de *M. anisopliae* y dos de *B. bassiana* demostraron un alto efecto acaricida contra *R. microplus* (larvas y adultas) y la producción de huevos. No hubo diferencias en el efecto acaricida de las cepas de HE entre las dos poblaciones de garrapatas, una multirresistente y otra susceptible a acaricidas químicos. Esto demuestra que las cepas de HE aisladas de suelos de UPB en el trópico, podrían ser una alternativa para el control de *R. microplus* en un programa integrado de control de garrapatas, incluidos las poblaciones resistentes. *M. anisopliae* es el género de HE más prevalente en los suelos de UPB, donde la materia orgánica, la altura y la aplicación de herbicidas son factores que influyen en dicha prevalencia. Finalmente, se encontró una probable variación filogenética en ambos géneros estudiados, pero para esclarecer este hallazgo se requieren estudios genéticos con la capacidad de identificar hasta nivel de subespecies de HE.

X. BIBLIOGRAFÍA

Abott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.

Aguilar C, Pujol I, Sala J, Guarro J. 1998. Antifungal susceptibilities of *Paecilomyces* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 1601–1604.

Aguirre EJ, Santamaría VM. 1986. Purificación y caracterización toxicológica de garrapatas *B. microplus* resistentes a ixodicidas organofosforados y organoclorados. Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria A.C. Ciudad Victoria, Tamaulipas, México.

Alonso-Díaz MA, Fernández-Salas A, Basurto CH. 2013. *Manual Técnico: La Garrapata Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Su Comportamiento, Control y Resistencia a los Acaricidas en el Trópico Mexicano: 21° día del ganadero* (ed. by B. Valles & H. Basurto), pp. 19 - 30. COFUPRO - FUNPROVER - UNAM., Martínez de la Torre, Veracruz, México.

Alonso-Díaz MA, García L, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutiérrez R, Ángel-Sahagun CA, Rodríguez-Vivas RI, Fragoso-Sánchez H. 2007. Evaluation of *Metarhizium anisoplae* (*Hyphomycetes*) for the control of *Boophilus microplus* (*Acari: Ixodidae*) on naturally infested cattle in mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 147: 336-340.

Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Vivas RI, Fragoso-Sánchez H, Rosario-Cruz R. 2006. Resistencia de *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 68: 105-113.

Alves SB, Ferraz LCCB, Castello-Branco JrA. 1998. Chaves para identificação de patógenos de insetos. In S. B. Alves (ed) *Controle Microbiano de Insetos*, 2nd edition, FEALQ, Piracicaba Brazil.

Alves SB. 1998. Fungos entomopatogênicos. *Controle Microbiano de Insetos* (ed. By S.B. Alves), pp 289-382. FEALQ, Piracicaba.

Amaro BCS, Almazán GC, Medellín LJA, Cantú CA, Velasco GE. 2011. Evaluación del efecto de dos cepas de *Metarhizium anisopliae* sobre la infestación de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos. Segundo

Encuentro Universitario. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Cd. Victoria, Tamaulipas, México. Libro de Memorias en Extenso. ISBN-978-607-7654-36-0. 45-47. <http://www.siyu.uat.edu.mx/investigacion/Encuentro2011.pdf>. Último acceso: may-15-2016.

Angelo IC, Fernandes EKK, Bahiense TC, Perinotto WMS, Golo PS, Moraes APR, Bittencourt VREP. 2012. Virulence of *Isaria* sp. and *Purpureocillium lilacinum* to *Rhipicephalus microplus* tick under laboratory conditions. Parasitol Res, 111, 1473–1480.

Angelo IC, Go PS, Camargo MG, Kluck GEG, Folly E, Bittencourt VREP. 2010. Haemolymph protein and lipid profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infected by fungi. Transboundary and Emerging Diseases, 57: 79–83.

Ángel-Sahagún CA, Lezama-Gutiérrez R, Molina-Ochoa J, Pescador-Rubio A, Skoda SR, Cruz-Vázquez C, Lorenzoni AG, Galindo-Velasco E, Fragoso-Sánchez H, Foster JE. 2010. Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus = Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. Vet Parasitol, 170: 278–286.

Anónimo. 1997. Como combatir garrapatas con la vacuna Gavac. México Ganadero. Órgano Oficial de la Confederación Nacional Ganadera, 429: 14-15.

Arguedas M, Álvarez V, Bonilla R. 2008. Eficacia del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en el control de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Agronomía Costarricense, 32: 137-147.

Arruda W, Lübeck I, Schrank A, Vainstein MH. 2005. Morfological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* tick. Experimental and Applied Acarology, 37: 231-244.

Asensio L, Carbonell T, López-Jiménez JA, López-Llorca V. 2003. Entomopathogenic fungi in soils from Alicante province. Spanish Journal of Agricultural Research, 1: 37-45.

Augustyniuk-Kram A y Kram KJ. 2012. Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forest (Review), Forest Ecosystems – More than just trees. Juan A. Blanco (Ed), ISBN: 978-953-51-0202-1.

Azevedo JL, Melo IS. 1998. Controle microbiano de insectos - pragas e seu melhoramento genético. In: Controle Biológico. Jaguariúna: Embrapa, 1: 69-93.

Bacca T y Lagos BTC. 2014. Efecto de *Beauveria bassiana* y del entomonematodo *Steinernema* sp. sobre larvas de *Galleria mellonella*. Bol Cient Mus Hist Nat U de Caldas, 18: 247-258.

Baeteman R. 1997. The development of a mycoinsecticide for the control of locust and grasshoppers. Outlook on Agriculture, 26: 13-18.

Barre N. 1988. Mesures agronomiques permettant une diminution des populations de la tique *Amblyomma variegatum* . Revue Elev. Med. Vet. Pays.Trop, 41: 387-393.

Barret, CC, Staats CC, Schrank A, Vainstein MN. 2004. Distribution of Chitinases in the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and Effect of *N*-Acetylglucosamine in Protein Secretion. Current Microbiology, 48: 102-107.

Basaure, 2006. Microorganismos: nutrición y crecimiento. Manual de lombricultura. Santiago (región metropolitana) de Chile. Consultado el 22 de diciembre del 2016. <http://www.manualdelombricultura.com/foro/mensajes/24224.html>. 3 pp.

Becerra-Velásquez V, Paredes-Cárcamo M, Rojo-Meriño C, France-Iglesias A, Franco-Durán J. 2007. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. Genet Mol Biol, 30: 89–99.

Beckett EB. 1990. Development and ageing of the salivary glands of adult female *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes togoi* (Theobald) mosquitoes (Diptera: Culicidae). J Insect Morphol Embryol, 19: 277–290.

Benavides E, Rodríguez JJ, Romero A. 2000. Isolation and Partial Characterization of the Montecitos Strain of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1877) Multiresistant to Different Acaricides. Tropical Veterinary Diseases: Control and Prevention in the Context of the New World Order, 916: 668–671.

Beverley MA. 1996. The History of the Cattle Tick *Boophilus microplus* in Australia and Achievements in its Control. *International Journal of Parasitology*, 12: 1341-1355.

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.

Bidochka MJ, Kamp AM, Lavender TM, Deckoning J, De Croos JNA. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopilae*: Uncovering cryptic species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1335–1342.

Bischoff JF, Rehner SA, Humber RA. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101: 512–530.

Bittencourt VREP, Peralva SLFS, Viegas EC, Alves SB. 1996. Avaliação dos efeitos do contato de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com ovos e larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Rev Bras Parasitol Vet*, 5: 81–84.

Bloomquist J. 2003. Insecticidas: químicas y características. Radcliffe: Texto Mundial de MIP. Universidad de Minnesota. Último acceso el 04 de diciembre del 2016. <http://ipmworld.umn.edu>

Bruck DJ. 2004. Natural Occurrence of Entomopathogens in Pacific Northwest Nursery Soils and Their Virulence to the Black Vine Weevil, *Otiorhynchus sulcatus* (F.) (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 33: 1335-1343.

Buduba C. 2004. Laboratorio de Suelos - CIEFAP-UNPSJB. Patagonia Forestal - Año X N°1. Muestreo de suelos. Criterios básicos. 9 – 12.

Bull DL, Ahrens EH. 1988. Metabolism of Coumaphos in Susceptible and Resistant Strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 94-98.

Bullman GM, Muños-Cabeñas ME, Ambrústolo RR. 1996. El impacto ecológico de las lactonas macrocíclicas (endectocidas): una actualización comprensiva y comparativa. *Veterinaria Argentina*, 8: 3-15.

Burdon JJ y Silk J. 1997. Sources and patterns of diversity in plantpathogenic fungi. *Phytopathology*, 87: 664–669.

Burger TD, Shao R, Barker SC. 2014. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 76: 241–253.

Camargo MG, Golo PS, Angelo IC, Perinotto WMS, Sá FA, Quinelato S, Bittencourt VREP. 2012. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. *Vet. Parasitol*, 188: 140-147.

Campos RA, Boldo JT, Pimentel IC, Dalfovo V, Araújo WL, Azevedo JL, Vainstein MH, Barros NM. 2010. Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* spp. to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Genet Mol Res*, 9: 1421-1430.

Cañedo V y Ames T. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 62 pp.

Carillo FI, Suarez S, Sanz JR. 1995. Como obtener una buena muestra para el análisis de suelos. *Cenicafé. Avances Técnicos*, 214: 1-4 p.

Carr-Pérez A, Elósegui O, Bel-Padrón N. 2003. Aislamiento, caracterización morfológica y fisiológica del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Broum & Smith. *Fitosanidad*, 7: 27-32.

Casely JC, Atkin RK, Cussans CW. 1991. *Herbicide Resistance in Weeds and Crops*, Butterworth-Heinemann, Oxford. 211 p.

Castellanos HJL. 1993. El género *Boophilus*. Programa de acreditación de Médicos Veterinarios Zootecnistas. Campaña contra la garrapata. Normas y Procedimientos. México, D.F. pp. 36-50.

Castrillo LA, Griggs MH, Vandenberg JD. 2004. Vegetative compatibility groups in indigenous and mass-released strains of the entomopathogenic fungus

Beauveria bassiana: likelihood of recombination in the field. J Invertebr Pathol, 86: 26–37.

Castro-Janer E, Martins J, Mendes M, Namindome A, Klafke G, Schummaker T. 2010. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. Veterinary Parasitology, 173: 300-306.

Cen AJ, Rodríguez VRI, Domínguez AJL, Wagner G. 1998. Studies on the effect on infection by *Babesia* spp. on oviposition of *Boophilus microplus* engorged females naturally infected in the Mexican tropics. Vet. Parasitol, 78: 253–257.

Céspedes Y, del Pozo, E, García I, Méndez A. 2008. Efecto de la temperatura sobre el hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson y su efectividad sobre *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. Rev Protección Veg, 3: 176-182.

Chen AC, He H, Davey RB. 2007. Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. Veterinary Parasitology, 148: 379-383.

Chen CS, Mulla MS, March RB, Chaney JD. 1990. Cuticular hydrocarbon patterns in *Culex quinquefasciatus* as influenced by age, sex, and geography. Bull Soc Vector Ecol, 15: 129–139.

Cherry LM. 1969. The production of cuticle wax by engorged females of the cattle tick, *Boophilus microplus* (canestrini). J Exp Biol, 50: 705-709.

Chun J, Riehle M, Paskewitz SM. 1995. Effect of mosquito age and reproductive status on melanization of sephadex beads in Plasmodium-refractory and -susceptible strains of *Anopheles gambiae*. J Invertebr Pathol, 66: 11–17.

Clifton EH, Jaronski ST, Hodgson EW, Gassmann AJ. 2015. Abundance of Soil-Borne Entomopathogenic Fungi in Organic and Conventional Fields in the Midwestern USA with an Emphasis on the Effect of Herbicides and Fungicides on Fungal Persistence. PLoS ONE, 10: 17 pp.

Cruz VC. 1995. Caracterización inmunoquímica de proteínas de superficie de intestino de garrapatas *Boophilus microplus*. Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

D'Alessandro WB, Humber RA, Luza C. 2012. Occurrence of pathogenic fungi to *Amblyomma cajennense* in a rural area of Central Brazil and their activities against vectors of Rocky Mountain spotted fever. *Vet Parasitol*, 188: 156– 159.

da Silva SB, Savastano G, Bittencourt VREP. 2006. Tipos celulares involucrados na resposta imune de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* inoculados com *Metarhizium anisopliae* e *Penicillium* sp. *Rev Bras Parasitol Vet*, 15: 128-131.

Dantigny P y Nanguy S. 2009. Significance of the physiological state of fungal spores. *International Journal of Food Microbiology*, 134: 16-20.

de Faria MR y Wraight, S.P. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43: 237–256.

de la Fuente J, Estrada-Peña A, Venzal JM, Kocan KM, Somenshine DE. 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in human and animals. *Frontiers in Bioscience*, 13: 6938-6946.

Deacon JW. 1997. *Modern Mycology*, 3rd. ed. Blackwell Science Ltd. Cambridge, p 303.

Devi V. 2000. Research on microbial control of insect pest at DOR. *Newsletter*, 6: 29-33.

Díaz-Rivera E. 2012. Mecanismos moleculares y bioquímicos de resistencia a acaricidas en la garrapata común de los bovinos *Rhipicephalus microplus*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5 (1): 72 – 81.

Dimbi S, Maniania NK, Lux SA, Mueke JM. 2004. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *Biocontrol*. 49: 83–94.

Dominguez-García D, Rosario-Cruz R, García C, Oaxaca J, De la Fuente J. 2010. *Boophilus microplus*: aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12: 181–192.

Domsch KH, Gams W, Anderson TH. 1980. Compendium of Soil Fungi, vol. 1. London: Academic Press, 893p.

Drummond RO, Graham OH, Ernest SE. 1967. *Evaluation of insecticides for the control of B. annulatus (Say) and B. microplus (Canestrini) (Acari: Ixodidae) on cattle.* In: II International Congress on Acarology. pp 493-498.

Encinas GA, Olega PA, Pérez SR. 1999. Garrapatas duras en corderos. Parasitología Veterinaria. Ed. McGraw-Hill-interamericana. Barcelona, España. pp. 420-429.

Estrada-Peña A, García VZ, Fragoso SH. 2006. The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) in Mexico. *Experimental and Applied Acarology*, 38: 307-316.

Estrada-Peña A, Venzal JM, Nava S, Mangold A, Guglielmone AA, Labruna MB. 2012. Reinstatement of *Rhipicephalus (Boophilus) australis* (Acari: Ixodidae) with redescription of the adult and larval stages. *Journal of Medical Entomology*, 49: 794–802.

Estrada-Peña A. 2001. Forecasting habitat suitability for ticks and prevention of tick-borne diseases. *Veterinary Parasitology*, 98: 111–132.

Fargues J, Maniania NK, Delmas JC, Smits N. 1992. Influence de la température sur la croissance in vitro d'hyphomycètes entomopathogènes. *Agronomie*, 12: 557–564.

Feng MG, Poprawsky TJ, Khachatourians GC. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current Status. *Biocontrol Science and Technology*, 4: 3-34.

Fernandes EKK, Angelo IC, Rangel DEN, Bahiense TC, Moraes AML, Roberts DW, Bittencourt VREP. 2011. An intense search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. *Vet Parasitol*, 182: 307–318.

Fernandes EKK, Bittencourt VERP. 2008. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Experimental and Applied Acarology*, 46: 71–93.

Fernandes EKK, Costa GL, Moraes AML, Zahner V, Bittencourt VREP. 2006. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. Parasitology Research, 98: 324-332.

Fernandes EKK, da Costa GL, De Morales AML, Bittencourt VREP. 2004. Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Journal of Basic Microbiology, 4: 270–274.

Fernandes EKK, da Costa GL, de Souza, de Moraes AM, Bittencourt VREP. 2003. *Beauveria bassiana* isolated from engorged females and tested against eggs and larvae of *Boophilus microplus*. J Basic Microbiol, 43: 393–398.

Fernandes EKK, Rangel DEN, Moraes AML, Bittencourt VREP, Roberts DW. 2008. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. J Invertebr Pathol, 98: 69–78.

Fernandes ÉKK, Rangel DEN, Moraes AML, Bittencourt VREP, Roberts DW. 2007. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. Journal of Invertebrate Pathology, 96: 237-243.

Fernández-Linares LC, Rojas-Avelizapa NG, Roldán-Carrillo TG, Ramírez-Islas ME, Zegarra Martínez HG, Uribe-Hernández R, Reyes Ávila RJ, Flores Hernández D, Arce Ortega JM. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. SEMARNAT – INE – IMP. Instituto Mexicano del Petróleo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología México, D. F. ISBN 968-489-039-7. 180 pp.

Fernández-Salas A, Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Vivas RI, Basurto-Camberos H. 2012c. Ivermectin resistance status and factors associated in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) populations from Veracruz, Mexico. Veterinary Parasitology, 190: 210-215.

Fernández-Salas A, Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA. 2012a. Resistance of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to amitraz and cypermethrin in tropical cattle farms in Veracruz, Mexico. Journal of Parasitology, 98: 1010-1014.

Fernández-Salas A, Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA. 2012b. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 183: 338-342.

Ferron P, Fargues J, Riba G. 1991. Fungi as microbial insecticides against pests, p. 665-705. In DK Arora, L Ajello, KG Mukerji (eds), *Handbook of Applied Mycology*, Vol. 2, Humans, Animals and Insects, Marcel Dekker Inc., New York.

Ferron P. 1967. Essais préliminaires de la lutte contre les larves du hanneton commun, *Melolontha melolontha* L. à l'aide de la mycose a *Beauveria tenella* (Delacr.) Siemaszko. *Phytiatrie- Phytopharmacie*, 16: 115–123.

Ferron P. 1978. Biological control of insect pest by entomogenous fungi. *Ann. Rev. Entomol*, 23: 409-442.

Fogaça AC, Almeida IC, Eberlin MN, Tanaka AS, Bulet P, Daffre S. 2006. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. *Peptides*, 27: 667–674.

Fragoso H, Soberanes N, Ortiz M, Santamaría M, Ortiz A. 1995. Epidemiología de la resistencia a ixodicidas piretroides en garrapatas *Boophilus microplus* en la República Mexicana. En: Rodríguez, S., Fragoso, H. editores. *Seminario Internacional de Parasitología Animal-Resistencia y Control en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria*. Acapulco, Guerrero, México, 45-57.

Fragoso SH, García VZ. 1999. Evaluación de la vacuna contra la garrapata Bm86 (Gavac) para el control de *Boophilus microplus*. IV Seminario Internacional de Parasitología. Octubre 20-22; Puerto Vallarta, Jalisco. México. CONASAG, INIFAP, INFARVET, IICA, AMPAVE, FILSA. pp.47-50.

Freed S, Jin FL, Ren SX. 2011. Determination of genetic variability among the isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* form different geographical origins. *World J Microbiol Biotechnol*, 27: 359–370.

Galán-Franco LA, Morales-Loredo A, Alvarez-Ojeda G, López-Arroyo JI, Arévalo-Niño K, Sandoval-Coronado C, Quintero-Zapata I. 2011. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi obtained from Citrus-Growing areas of Mexico. *Southwestern Entomologist*, 36: 443-449.

García Vázquez Z. 2010. Garrapatas que afectan al ganado bovino y enfermedades que transmiten en México. 1er. Simposio de Salud y Producción de Bovinos de Carne en la Zona Norte-Centro de México. Aguascalientes, Ags. 9 paginas.

Garrido-Jurado I, Torrent J, Barrón V, Corpas A, Quesada-Moraga E. 2011. Soil properties affect the availability, movement, and virulence of entomopathogenic fungi conidia against puparia of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 58, 277–285.

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

Gindin G, Samish M, Alekseev E, Glazer I. 2001. The Susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) ticks to entomopathogenic fungi. *Biocontrol Sci. Technol*, 11, 111–118.

Gindin G, Samish M, Zangi G, Mishoutchenko A, Glazer I. 2002. The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. *Experimental and Applied Acarology*, 28: 283–288.

Godoy JC, Valera RE, Guédez C, Cañizalez LM, Castillo C. 2007. Optimum temperature and humidity determination in germination and sporulation of five *Beauveria bassiana* isolates. *Rev Fac Agron (LUZ)*, 24: 415-425

Gottar M, Gobert V, Matskevich AA, Reichhart JM, Wang C, Butt TM, Belvin M, Hoffmann JA, Ferrandon D. 2006. Dual Detection of Fungal Infections in *Drosophila* via Recognition of Glucans and Sensing of Virulence Factors. *Cell*, 127: 1425–1437.

Guerrero DF, Davey BR, Miller JR. 2001. Use of an allele specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 38: 44-50.

Guglielmone A, Robbins R, Apanaskevich D, Petney T, Estrada-Peña A, Horak I, Shao R, Barker S. 2010. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, 2528: 1-28.

Hajek AE. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Advances in Microbial Ecology*, 15: 193–249

Hall RA, Perkin D, Ali B. 1995. Fungal Control of Whitefly, Thrips palmi and Sugarcane Froghopper in Trinidad Tobago. VI International Colloquium on Interthrate Pathology and Microbial Control.

Hall RA. 1993. The use of pathogens to control whiteflies in Europe and the Tropics: Possibilities for integrated control. En: II Taller Latinoamericano y del Caribe sobre moscas blancas y geminivirus. Managua, Nicaragua. Pp 35-56.

Harris K, Young IM, Gilligan CA, Otten W, Ritz K. 2003. Effect of bulk density on the spatial organisation of the fungus *Rhizoctonia solani* in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 44: 45-56.

Harrison RD y Gardner WA. 1992. Fungistasis of *Beauveria bassiana* by selected herbicides in soil. *J Entomol Sci*, 27: 233-238.

Hassan AEM, Dillon RJ, Charnley AK. 1989. Influence of accelerated germination of conidia on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *J Invertebr Pathol*, 54: 277–279.

Havron A, Rosen D, Riessler Y. 1987. A test for pesticide tolerance in minute parasitic Hymenoptera. *Entomophaga* 32, 83-95.

Hawkes N, Janes R, Hemingway J, Vontas J. 2005. Detection of resistance-associated point mutations of organophosphate-insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin). *Pesticide Biochemistry Physiology*, 81: 154-163.

Hemingway J, Hawkes N, McCarroll L, Ranson H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 34: 653-665.

Hernández-Domínguez C, Guzmán-Franco AW, Carrillo-Benítez MG, Alatorre-Rosas R, Rodríguez-Leyva E, Villanueva-Jiménez JA. 2016. Specific Diversity of *Metarhizium* Isolates Infecting *Aeneolamia* spp. (Hemiptera: Cercopidae) in Sugarcane Plantations. *Neotrop Entomol*, 45: 80–87.

Hernández-Velázquez VM, Cervantes-Espíndola Z, Villalobos FJ, García LL, Peña-Chora G. 2011. Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (coleóptera: melolonthidae) en agroecosistemas de maíz. *Acta Zoológica Mexicana*, 27: 591-599.

Hoffman CS y Winston F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57: 267-272.

Hoffmann A, López-Campos G. 2000. Biodiversidad de los Ácaros en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. CONABIO UNAM. ISBN: 970-9000-14-4. México. 230 p.

Holdsworth PA, Kemp D, Green P, Peter RJ, De Bruin C, Jonsson NN, Letonja T, Rehbein S, Vercruyse J. 2006. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants. *Veterinary Parasitology*, 136: 29–43.

Hornbostel VL, Ostfeld RS, Zhioua E, Benjamin MA. 2004. Sublethal effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) on engorged larval, nymphal, and adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol*, 41: 922–929.

Huising EJ, Coe R, Cares JE, Louzada JN, Zanetti R, Moreira FMS, Susilo F, Konaté S, Noordwijk M, Huang SP. 2011. **Manual de biología de suelos tropicales.** Moreira F, Huising EJ, Bignell D (Eds). Diseño y estrategias de muestreo para la evaluación de la biodiversidad del suelo, 2: 53 – 90.

Humber RA. 1997. Fungi: Identification. in: Manual of techniques in insect pathology. Biological techniques series. Lacey, L (ed.)California (USA). Academic Press. Pp 153 - 185.

Humbert RA. 2012. Identification of entomopathogenic Fungi. In: L. Lacey (Ed.). Manual of Techniques in Insect Pathology. 2da. Edition. Academic Press. Pp. 151-187.

Ibrahim L, Butt TM, Beckett A, Clark SJ. 1999. The germination of oil formulated conidia of the insect pathogen, *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res*, 103: 901–907.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Información). 2010. Boletín de información oportuna del sector agropecuario No. 300. Aguascalientes, Ags. 91 p.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Información). 2008. Anuario estadístico del Estado de Veracruz. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, México, 265 p.

INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). 2000. Técnicas de toma y remisión de muestras de suelos. Centro regional misiones. Estación experimental agropecuaria Cerro Azul. Pp 1-4.

IRAC (Insecticide Resistance Action Committee). 2016. Acaricide Mode of Action. Classification: A key to effective acaricide resistance management. Último acceso el 07 de diciembre del 2016. <http://www.irac-online.org/documents/mites-moa-poster/>

Jarrold SL, Moore D, Potter U, Charnley AK. 2007. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycol Res*, 111: 240–249.

Jeffs BLL, Xavier IJ, Matai RE, Kachatourians GG. 1999. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* y *Verticillium*. *Can J Microbiol*, 45: 936-948.

Johns R, Sonenshine DE, Hynes WL. 1998. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. *J Med Entomol*, 35: 458–464.

Kaaya GP, Hassan S. 2000. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Experimental and Applied Acarology*, 24: 913-923.

Kaaya GP, MWangi EN, Ouna EA. 1996. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum* using entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J Invert Pathol*, 67: 15-20.

Kaaya GP. 2000. Laboratory and Field Evaluation of Entomogenous Fungi for Tick Control. *Annals of the New York Academy of Sciences. Tropical Veterinary diseases: control and prevention in the context of the new world order*, 916: 559–564.

Kearney S. 2013. Acaricide (Chemical) Resistance in Cattle Ticks. Agnote No: K58

Keissi L. 2014. Razas Bos taurus y Bos indicus. *Zootecnia para un futuro mejor*. <https://zootecniaparaunfuturomejor.wordpress.com/2014/09/21/razas-bos-taurus-y-bos-indicus/>. Consultado el 29 enero 2017.

Kepler RM, Humber RA, Bischoff JF. 2014. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, 106: 811–829.

Kirkland BH, Cho EM, Keyhani NO. 2004a. Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Biol. Control*, 31: 414–421.

Kirkland HB, Westwood SG, Keyhani ON. 2004b. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Ixodes scapularis*. *Journal of Medical Entomology*, 41: 705-711.

Klein-Koch C. 1997. Acción de reguladores del crecimiento e inhibidores del desarrollo en insectos y ácaros. *Revista Peruana de Entomología*, 5: 13-17.

Kurtti T, Keyhani N. 2008. Intracellular infection of tick cell lines by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology*. 154: 1700-1709.

Lee SY, Nakajima I, Ihara F, Kinoshita H, Nihira T. 2005. Cultivation of entomopathogenic fungi for the search of antibacterial compounds. *Mycopathologia*, 160: 321-325.

Leemon DM, Turner LB, Jonsson NN. 2008. Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Veterinary Parasitology*, 156: 248-260.

Lew-Tabor AE, Bruyeres AG, Zhang B, Valle MR. 2014. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick in vitro feeding methods for functional (dsRNA) and vaccine candidate (antibody) screening. *Ticks and Tick Borne Disease*, 5: 500–510.

Lezama-Gutiérrez R, Hamm JJ, Molina-Ochoa J, López-Edwards M, Pescador-Rubio A, González-Ramírez M, Styer EL. 2001. Occurrence of Entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican States of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas. *Florida Entomologist*, 84: 23-30.

Li J, Feng MG. 2009. Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. *Mycology Research*, 113: 93-99.

Li J, Tracy JW, Christensen BM. 1992. Relationship of hemolymph phenol oxidase and mosquito age in *Aedes aegypti*. *J Invertebr Pathol*, 60: 188–191.

Li SP, Li P, Dong TT, Tsim KW. 2001. Anti-oxidation activity of different types of natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps* mycelia. *Phytomedicine*. 8: 207–212.

Liming T, Mingan S, Jiangzhong Y, Peijun Z, Chuanxi Z, Zhenhua T. 2006. Resistance pattern and point mutations of insensitive acetylcholinesterase in a carbamate-resistant strain of housefly (*Musca domestica*). *Pesticide Biochemistry Physiology*, 86: 1-6.

Liu H, Skinner M, Parker BL, Brownbridge M. 2002. Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), and other entomopathogenic fungi against *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *J. Econ. Entomol*, 95: 675–681.

Liu N, Scott JG. 1998. Increased transcription of CYP6D1 causes cytochrome P450-mediated insecticide resistance in house fly. *Insect Biochem Molec*, 28: 531-535.

López LV, Hans Börje J. 2001. Biodiversidad del suelo: control biológico de nemátodos fitopatógenos por hongos nematófagos. Cuaderno de Biodiversidad, 6: 12-15.

López-Lastra CC, Hajek AE, Humber RA. 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. Canadian Journal of Botany, 80: 1126-1130.

Lord JC y Howard RW. 2004. A Proposed Role for the Cuticular Fatty Amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae) in Preventing Adhesion of Entomopathogenic Fungi with Dry-conidia. Mycopathologia, 158: 211-217.

Low VL, Tay ST, Kho KL, Koh FX, Tan TK, Lim YAL, Ong BL, Panchadcharam C, Norma-Rashid Y, Sofian-Azirun M. 2015. Molecular characterisation of the tick *Rhipicephalus microplus* in Malaysia: new insights into the cryptic diversity and distinct genetic assemblages throughout the world. Parasites & Vectors, 8: 341-351.

Lozano HME. 2014. Situación sanitaria de la babesiosis y anaplasmosis en la ganadería lechera en tres sistemas de producción. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. 52 páginas.

Malik KA y Hoffman P. 1993. Long-term preservation of yeast culture by liquid drying. W J Microbiol Biotechnol, 9: 372.

Marmaras VJ, Charalambidis ND, Zervas CG. 1996. Immune response in insects: the role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 31: 119-133.

Marshall WJ. 1995. IPM of Thrips palmi in vegetables, Plenum Press, Nueva York.

Mateos PF. 2004. Nutrición de los microorganismos. Temas selectos de nutrición microbiana. Departamento de Microbiología y Genética. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Consultado el 15 de enero de 2017. <http://webcd.usal.es/web/educativo/micro2/tema05.html#anchor151200>.

Melo DR, Reis RCS, Bittencourt VREP. 2006. Patogenicidade in vitro do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Rev Bras Parasitol, 15: 157–162.

Mena HD, Castillo JA, Marín JA. 2013. Resultados preliminares sobre la calibración de un kit portátil para análisis químico de suelos. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 30: 79 - 86.

Ment D, Gindin G, Soroker V, Glazer I, Rot A, Samish M. 2010. *Metarhizium anisopliae* conidial responses to lipids from tick cuticle and tick mammalian host surface. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: 132–139.

Metcalf RL. 1989. Insect resistance to insecticides. *Pesticide Science*, 26: 333-358.

Meyling NV, Eilenberg J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biol Control*, 43: 145–155.

Meyling NV, Lübeck M, Buckley EP, Eilenberg J, Rehner SA. 2009. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Molecular Ecology*, 18: 1282–1293.

Miller RJ, Davey RB, George JE. 1999. Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 36: 533-538.

Miller TA. 1998. Mechanism of resistance to pyrethroid insecticides. *Parasitology Today*, 4: 8-12.

Mitchell TG. 2002. Fungal pathogens of humans. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, pp. 1–15.

Mnyone LL, Kirby MJ, Mpingwa MW, Lwetoijera DW, Knols BGJ, Takken W, Koenraadt CJM, Russell TL. 2011. Infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes with entomopathogenic fungi: effect of host age and blood-feeding status. *Parasitol Res*, 108: 317–322.

Mohamed AKA, Sikorowski P, Bell JV. 1977. The susceptibility of *Heliothis zea* larvae to *Nomuraea rileyi* at various temperatures. *J Invertebr Pathol*, 12: 444–459.

- Molina NC, Andina-Guevara DP, Fernandez de Ullivarri J.** 2006. Físico-química del suelo. Facultad de Agronomía y Zootecnia-Universidad Nacional de Tucumán. 34 pp.
- Moorhouse ER, Gillespie AT, Charnley AK.** 1993. Selection of virulent and persistent *Metarhizium anisopliae* isolates to control black vine weevil (*Otiorynchus sulcatus*) larvae on glasshouse begonia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 62: 47-52.
- Mourya DT, Hemingway J, Leake CJ.** 1993. Changes in enzyme titres with age in four geographical strains of *Aedes aegypti* and their association with insecticide resistance. *Med Vet Entomol*, 7: 11–16.
- Murrell A, Barker SC.** 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtis, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari. Ixodidae). *Systematic Parasitology*, 56: 169-172.
- Navarro-García G y Navarro-García S.** 2013. Química Agrícola. Química del suelo y de los nutrientes esenciales para las plantas. 3ª edición. Editorial Mundi Prensa. ISBN: 978-84-8476-656-8.España. 639 pp.
- Neelapu NR, Reineke A, Chanchala UM, Koduru UD.** 2009. Molecular phylogeny of asexual entomopathogenic fungi with special reference to *Beauveria bassiana* and *Nomuraea rileyi*. *Rev Iberoam Micol*, 26:129-145.
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO.** 1983. *Fusarium* Species: an Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park and London, 193p.
- Newman GG y Carner GR.** 1975. Environmental factors affecting conidial sporulation and germination of *Entomophthora gammae*. *Environmental Entomology*, 4: 615-618.
- Nuñez JL, Cobeñas MME, Moltedo HL.** 1982. *Boophilus microplus*, la garrapata común del ganado vacuno. Hemisferio Sur. Editor, Buenos Aires, Argentina. pp.. 53-70.
- Ojeda-Chi MM, Rodríguez-Vivas RI, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutiérrez R.** 2010. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* for the control of

Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 170: 348-354.

Ojeda-Chi MM, Rodríguez-Vivas RI, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutiérrez R. 2011. Control de *Rhipicephalus microplus* mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 2: 177-192.

Oliver JrJH. 1989. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Annual Review of Ecology and Systematics*. 20: 397-430.

Ormond EL, Thomas AP, Pugh PJ, Pell JK, Roy HE. 2010. A fungal pathogen in time and space: the population dynamics of *Beauveria bassiana* in a conifer forest. *Microbiology Ecology*, 74: 146-154.

Ortiz-Catón M, Alatorre-Rosas R, Valdivia-Bernal R, Ortiz-Catón A, Medina-Torres R, Alejo-Santiago G. 2011. Effect of temperature and relative humidity on entomopathogenic fungi development. *Biociencias*, 2: 42-53.

Osborne LS y Landa Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Entomologist*, 75: 456-471.

Ouedraogo A, Fargues J, Goettel MS, Lomer CJ. 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia*, 137: 37-43.

Paião JCV, Monteiro AC, Kronka SN. 2001. Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. *World J Microbiol Biotechnol*, 17: 245-251.

Parra JRP, Botelho PSM, Correa-Ferreira BS, Bento JMS. 2002. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. Ed. Manole, São Paulo, Brasil. 609 páginas.

Pendland JC y Boucias DG. 1997. In vitro growth of the entomopathogenic hyphomycete *Nomuraea rileyi*. *Mycologia*, 89: 66-71.

Peniche-Cardena AEJ, Hernández MJ, Scheleske MI, Martínez HDI, Romero SD, Barradas LHV, Soto RI, Barradas PFT, Rosado-Aguilar JA, Rodríguez-

Vivas RI. 2012. Evaluación de la resistencia de *Rhipicephalus microplus* a cipermetrina y amitraz en bovinos de Comapa y Manlio F. Altamirano, Veracruz, México. XXV Reunión Científica, Tecnológica, Forestal y Agropecuaria de Veracruz y IV del Trópico Mexicano. 4pp.

Pérez-González VH, Guzmán-Franco AW, Alatorre-Rosas R, Hernández-López J, Hernández-López A, Carrillo-Benítez MG, Baverstock J. 2014. Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. *Journal of Invertebrate Pathology*, 119: 54–61.

Perinotto WMS, Angelo IC, Golo PS, Quinelato S, Camargo MG, Sá FA, Bittencourt VREP. 2012a. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. *Experimental Parasitology*, 130: 257-260.

Perinotto WMS, Terra ALM, Angelo IC, Fernandes EKK, Golo PS, Camargo MG, Bittencourt VREP. 2012b. *Nomuraea rileyi* as biological control agents of *Rhipicephalus microplus* tick. *Parasitology Research*, 111: 1743–1748.

Peter RJ, Van den Bossche P, Penzhorn BL, Sharp B. 2005. Tick, fly and mosquito control —lessons from the past, solutions for the future. *Veterinary Parasitology*, 132: 205-215.

Piccione G, Giannetto G, Assenza A, Casella S, Caola G. 2009. Influence of time of day on body temperature, heart rate, arterial pressure, and other biological variables in horses during incremental exercise. *Chronobiol Int J Biol Med Rhythm Res*, 26: 47–60.

Pirali-Kheirabadi K, Haddadzadeh H, Razzaghi-Abyaneh M, Bokaie S, Zare R, Ghazavi M, Shams-Ghahfarokhi M. 2007. Biological control of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* by different strains of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium psalliotae* fungi. *Parasitol. Res*, 100: 1297–1302.

Polar P, Kairo MTK, John SA, Peterkin D, Moore D, Pegram R. 2005a. Assessment of fungal isolates for development of amyco-acaricide for cattle tick control. *Vector-borne Zoonotic Dis*, 5: 276–284.

Polar P, De Muro MA, Cairo MTK, John SA, Moore D, Pegram R, John SA, Roach-Benn C. 2005b. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates

important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. *Vet Parasitol*, 134: 159–167.

Polar P, Moore D, Kairo MTK, Ramsubhag A. 2008. Topically applied mycoacaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. *Exp. Appl. Acarol*, 46: 119–148.

Popham TW, Garris GI. 1991. Considerations when modeling alternative eradication strategies for *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) In Puerto Rico. *Journal of Agricultural Entomology*, 8: 271-289.

Poprawski T y Majchrowicz I. 1995. Effects of herbicides on in vitro vegetative growth and sporulation of entomopathogenic fungi. *Crop Proreccion*, 14: pp. X1-87.

Poprawski TJ y Jones WJ. 2000. Host plant effects on activity of mitosporic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against two populations of *Bemisia whiteflies* (Homoptera: Aleyrodidae). *Mycopathology*, 151: 11–20.

Prullage J, Tran H, Timmons P, Harriman J, Chester T, Powell K. 2011. The combined mode of action of fipronil and amitraz on the motility of *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, 179: 302-310.

Quesada-Moraga E, Navas-Cortés JA, Maranhao EAA, Ortiz-Urquiza A Santiago-Álvarez C. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research*, 111: 947–966.

Quiroz-Romero H. 2005. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. México: Limusa, 788-802pp.

Rangel DEN, Braga GUL, Anderson AJ, Roberts DW. 2005. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88: 116-125.

Rangel DEN, Braga GUL, Flint SD, Anderson AJ, Roberts DW. 2004. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. *J. Invertebr. Pathol*, 87: 77–83.

Rehner SA, Minnis AM, Sung Gi-Ho, Luangsa-ard JJ, Devetto L, Humber RA. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103: 1055–1073.

Reis RCS, Melo DR, Souza EJ, Bittencourt VREP. 2001. In vitro action of the fungi *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok on nymphs and adults of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). *Arq Bras Med Vet Zootec*, 53: 544–547.

Rendón SG. 1994. Muestreo. Aplicación en la estimación simultanea de varios parámetros. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 246 p.

Riddles PW, Davey PA, Nolan J. 1983. Carboxylesterases from *Boophilus microplus* hydrolyze trans-permethrin. *Pesticide Biochem Physiol*, 20: 133-140.

Ritchey KD, Silva JE, Costa UF. 1982. Calcium deficiency in clayey-B horizons of Savanna oxisols. *Soil Science*, 133: 378–382.

Ritz K y Young IM. 2004. Interactions between soil structure and fungi. *Mycologist*, 18: Part 2.

Rodríguez-Vivas RI y Cob-Galera LA. 2005. Técnicas Diagnósticas en Parasitología Veterinaria. 2^{nda} ed. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, pp 179-198.

Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Arévalo F, Fragoso-Sánchez H, Santamaria VM, Rosario-Cruz R. 2006a. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 136: 335-342.

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

Rodríguez-Vivas RI, Rodríguez-Arevalo F, Alonso-Díaz MA, Fragoso-Sanchez H, Santamaria VM, Rosario-Cruz R. 2006b. Amitraz resistance in *Boophilus*

microplus ticks in cattle farms from the state of Yucatan, Mexico, prevalence and potential risk factors. *Prev Vet Med*, 75: 280–286.

Rosario CR, Guerrero FD, Miller RJ, Rodríguez-Vivas RI, Domínguez-García DI, Cornel AJ, Hernández-Ortiz R, George JE. 2005. Roles played by Esterase activity and by a sodium channel mutation involved in pyrethroid resistance in populations of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) collected from Yucatan, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, 42: 1020-1025.

Rosario-Cruz R, Domínguez-García DI, Hernández-Ortiz R, Rojas-Ramirez E. 2007. Estrategias para el control integral de la garrapata *Boophilus microplus* y la mitigación de la resistencia. CENID-PAVET INIFAP, Jiutepec. Morelos, México. 12 pp.

Ryan J, Estefan G, Rashid A. 2001. Soil and Plant Analysis Laboratory Manual. Second Edition. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA)-National Agricultural Research Center (NARC). Available from ICARDA, Aleppo, Syria. 172 pp.

Samish M, Gindin G, Alekseev E, Glazer I. 2001. Pathogenicity of entomopathogenic fungi to different developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *J Parasitol*, 87: 1355–1359.

Samish M, Ginsberg H, Glazer I. 2004. Biological control of ticks. *Veterinary Parasitology*, 129 Suppl: S389-403.

Samish M, Ginsberg H, Glazer I. 2004b. Biological control of ticks. *Parasitology*, 129: 389–403.

Samish M, Ginsberg H, Glazer I. 2008. Anti-tick biological control agents: assessment and future perspectives. In: Bowman, A.S., Nuttall, A. (Eds.), *Tick Biology. Disease and Control*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 447–469.

Samson RA, Evans HC, Latge JP. 1987. An atlas of entomopathogenic fungi. Berlin: Springer-Verlag. 187 Pp.

Samuels KDZ, Pinnock DE, Allsopp PG. 1989. The potential of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deutermycotina, Hyphomycetes) as a biological

control agent of *Inopus rubriceps* (Macquart) (Diptera, Stratiomyidae). J Aust Entomol Soc, 28: 69–74.

Santamaria VM, Soberanes CN, Ortiz NA, Fragoso SH, Osorio MJ, Martínez IF, Franco BL, Delabra VG, Quezada DR, Giles HI, Ortiz EM. 1999. Análisis de la situación actual mediante el monitoreo de susceptibilidad a ixodicidas en *Boophilus microplus* de 1993 a 1999 y medidas preventivas para retardar la resistencia al amitraz en México. Seminario Internacional de Parasitología Animal, Control de la Resistencia en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria y Enfermedades que transmiten. Puerto Vallarta, Jalisco, México, 103-117.

SAS (Statistical Analysis System). 1991. Guide for Personal Computers, Version 6.03. SAS Institute Inc. SAS/STAT, Cary, NC, USA.

SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2016. Campaña Nacional para el control de la garrapata *Boophilus* spp. <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/campana-nacional-para-el-control-de-la-garrapata-boophilus-spp> [Consulta: 15 sept 2016].

SENASICA. 2012. Manual técnico para muestreo de productos agrícolas. www.senasica.gob.mx. [Consulta: 16 feb 2014].

Shah PA, Pell JK. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. Applied Microbiology and Biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology, 61: 413-23.

Shimazu M, Sato H, Maehara N. 2002. Density of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in forest air and soil. Applied Entomology and Zoology, 37: 19–26.

Skrobek B, Défago D, Butt G, Maurhofer M. 2005. Evaluation of different biological test systems to assess the toxicity of metabolites from fungal biocontrol agents. Toxicol Lett, 30: 1-10.

Smith P. 1993. Control of *Bemisia tabaci* and the potencial of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. Biocontrol News an Information, 14: 71-78.

Soberanes NC, Santamaría MV, Fragoso HS, García VZ. 2002. First case reported of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus* in Mexico. *Técnica Pecuaria México*, 40: 81- 92.

Soberanes-Céspedes N, Ortiz Estrada M. 2014. Programas de control integral de parásitos con énfasis en la garrapata del bovino *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus* en el noreste de México. *Lapisa, Salud Animal*. Último acceso el 07 de diciembre del 2016. <https://lapisa.wordpress.com/tag/impacto-economico-de-la-garrapata-del-bovino/>

Solís SS. 1991. Ecología de las garrapatas *Boophilus*: Perspectivas de un panorama. Memorias del II Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Octubre 9-11. Morelos, México. SARH-UNAM-UAEM-IICA-INIFAP. Pp.19-30.

Solís SS. 1993. Diversidad, distribución y abundancia de garrapatas en México. Campaña contra la garrapata. Instructivo Técnico. SAGAR-CNMVZ. México, D.F. pp. 27-35.

Sosa R, Delpin K, Moscardi F, Nozaki M. 2003. The Impact of Fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson Epizootics and on Populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Soybean. *Neotrop Entomol*, 32: 287-291.

Soulsby E.J.L. 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. Ed. Interamericana. México, D.F. Pp. 455-478.

Steinhaus EA. 1956. Microbial control: the emergence of an idea. *Hilgardia (Estados Unidos)* v. 26, p.107-1 57.

Storey GK y Gardner WA. 1987. Vertical movement of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia through 4 Georgia soil types. *Environmental Entomology*, 16: 178–181.

Sujii ER, Tigano MS, Sosa-Gomes D. 2002. Simulação do impacto do fungo *Nomuraea rileyi* em populações da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37: 1551–1558.

- Sun BD y Liu XZ.** 2008. Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. *Applied Soil Ecology*, 39: 100-108.
- Sun BD, Yu HY, Chen AJ, Liu XZ.** 2008. Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. *Crop Protection*, 27: 1421–1426.
- Sun M, Ren Q, Guan G, Li Y, Han X, Ma C, Yin H, Luo J.** 2013. Effectiveness of *Beauveria bassiana* [*sensu lato*] strains for biological control against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in China. *Parasitol. Int*, 62: 412-415.
- Tang L, Hou R.** 2001. Effects of environmental factors on virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, against the corn earworm, *Helicoverpa armigera* (Lep. Noctuidae). *J Appl Entomol*, 125: 243-248.
- Téllez-Jurado A, Cruz-Ramírez MG, Mercado-Flores Y, Asaff-Torres A, Arana-Cuenca A.** 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Rev Mex Micol*, 30: 73-80.
- Temeyer KB, Li AY, Lohmeyer KH, Chen AC, Olafson PU, Sanson DW, Foil LD.** 2007. Acetylcholinesterase mutation in diazinon-resistant *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Veterinary Parasitology*, 154: 300-310.
- Thomas MB y Read AF.** 2007. Fungal bioinsecticide with a sting. *Nature Biotechnology*, 25: 1367-1368.
- Tzou P, Reichhart JM, Lemaitre B.** 2002. Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants. *Proc Natl Acad Sci*, 99: 2152–2157.
- Utech KBW, Wharton RH, Kerr JD.** 1978. Resistance to *Boophilus microplus* in different breeds of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29: 885-895.
- Vanninen I.** 1996. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycological Research*, 100: 93 -101.
- Vega MC.** 1991. Actualidad e importancia de las enfermedades del ganado causadas por hemoparásitos. *Memorias del II Seminario Internacional de*

Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Octubre 9-11. Morelos, México. SARH-UNAM-UAEM-IICA-INIFAP. pp. 144-150.

Vey A, Matha V, Dumas C. 2002. Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. *J. Invertebr. Pathol*, 80: 177-187.

Wakil W, Ghazanfar MU, Riasat T, Kwon YJ, Qayyum, MA, Yasin M. 2013. Occurrence and diversity of entomopathogenic fungi in cultivated and uncultivated soils in Pakistan. *Entomol Res*, 43: 70-78.

Walker AR, Bouattour A, Camicas JL, Estrada-Peña A, Horak IG, Latif AA, Pegram RG, Preston PM. 2003. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. Ed. Bioscience Reports. Atalanta, Houten, The Netherlands. 221 páginas.

Wang C y St Leger RJ. 2005. Developmental and transcriptional responses to host and non-host cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* sf. *Acridum*. *Eukaryotic Cell*, 4: 937–947.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: a guide to methods and applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White, eds). Academic Press: 315-322.

Wollum AG, Cassel DK. 1978. Transport of microorganisms in sand columns. *Soil Science Society of America Journal* 42, 72–76.

Woodham CB, González OA, López LA, Guereña MR. 1983. Progresos en la erradicación de las garrapatas *Boophilus microplus* en México 1960-1968. *Revista Mundo Zootécnico*, 48: 18-24.

Zimmerman G. 1982. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40: 36-40.

Zimmermann G. 1986. The *Galleria* bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *J Appl Entomol*, 102: 213–215.

Zimmermann G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pestic Sci*, 37: 375-379.

XI. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

RH: Fernández-Salas et al. – FUNGI AGAINST *R. MICROPLUS*

Phylogenetic relationships and acaricidal effects of *Beauveria bassiana* obtained from cattle farm soils against *Rhipicephalus microplus*

Agustín Fernández-Salas, Miguel Ángel Alonso-Díaz*, Rogelio Alejandro Alonso Morales†, Roberto Lezama-Gutiérrez‡, José Antonio Cervantes-Chávez§

Facultad de Ingeniería Agronómica y Zootecnia, Complejo Regional Centro, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Carretera Cañada – Morelos Km. 7.5. El Salado, Tecamachalco, Puebla, México. Correspondence should be sent to: alonsodm@unam.mx

ABSTRACT: The objectives of the present study were to isolate *Beauveria bassiana* strains from cattle farms soils, to analyze the phylogenetic relationships among the isolated fungi strains, and to determine the acaricidal effect of *B. bassiana* isolates on *Rhipicephalus microplus* engorged ticks, resistant or susceptible to chemical acaricides. Six strains of *Beauveria bassiana* were obtained and isolated from cattle farms soils by *Galleria* bait method in Mexican tropics and the acaricidal effect was assessed against two populations of *R. microplus* (resistant or susceptible to chemical acaricides) using the adult immersion test. The BbV03 strain produced an 86.7% and a 60% of mortality on resistant and susceptible ticks, respectively; whereas the mortality scored with the BbV04 strain was 66.7% and 53.5% on resistant and susceptible ticks, respectively. The BbV03 and BbV04 strains reduced egg-laying on both *R. microplus* populations. There were not statistical differences in the acaricidal effect of *B. bassiana* strains, between the *R. microplus* susceptible or resistant populations ($P > 0.05$). The BbV03 strain was the most virulent against *R. microplus* with a LC_{50} of 2×10^7 and a LC_{99} of 7×10^8 conidia/ml. We found that the six *B. bassiana* isolated were clustered into the same clade with other previously reported *B. bassiana* strains (from GenBank); however, they were separated into three different sub-clades. This study shows that some *B. bassiana* strains might be a promising

coadjuvant alternative for biological tick control, including those that are resistant to chemical acaricides. *B. bassiana* is present in the pastures of tropic cattle farms and there are genetic variations between members of the *bassiana* specie that living in this ecosystem. This last showed that *Beauveria bassiana* might play an important roll in the natural control of *R. microplus* at paddocks of cattle farms.

Rhipicephalus microplus (Canestrini 1888) is considered one of the most important ticks, due to the transmission of pathogenic agents, the costs involved in treatment schemes and the growing populations of ticks resistant to acaricides (Fernández-Salas et al., 2011). The resistance phenomenon observed in *R. microplus*, coupled with the environmental contamination by secondary chemical metabolites, has motivated to open an investigation on new alternative tick control methods (Samish et al., 2004), such as the use of entomopathogenic fungi (EF).

The acaricidal effect of EF against *R. microplus* is high when it is evaluated *in vitro* (Paião et al., 2001; Perinotto et al., 2012; Sun et al., 2013); however, under tropical field conditions, this effect is usually reduced (Leemon et al., 2008). The evolutionary climatic adaptation of isolated EF in tropical areas might be an important positive factor in their efficacy against the ticks that are present in those environments, considering that foreign organisms might be most susceptible to extreme climatic factors than native fungi, particularly for temperature and UV-rays (Rangel et al., 2005). The soil is the main micro-ecosystem, where a high diversity of microorganisms is cohabiting with each other; so, they have the potential to colonize and kill insects and ticks (Perinotto et al., 2012). Therefore, these organisms (including EF) play an important role in the natural control of tick populations, especially in the paddocks of tropical cattle farms. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912, is an important natural tick pathogen (Fernandes and Bittencourt, 2008), and is one of the most studied biological control agents, mainly due to several positive characteristics, such as: (1) its extensive insect host range; (2) its high pathogenicity to target pests; (3) has an easy and inexpensive production; (4) has a rapid growth and abundant sporulation; and (5) is non-pathogenic to the cells of mammals or plants (Feng et al., 1994).

Considering the high and complex chemical resistance that has been observed in ticks, it is desirable for the EF to be effective against susceptible and resistant tick populations. Different tick populations might show distinct susceptibility levels to biological control using EF, so the genotypic characteristics are an important factor to be considered as well. Thus, when a tick population is resistant to chemical acaricides, it is inappropriate to neglect the possible interference of the tick resistance mechanism in the EF performance (Perinotto et al., 2012).

Moreover, when the EF are isolated in order to be used as biological controls, it is important to identify them correctly. Usually, this identification is carried out only by morphologic and culture traits; however, this might not be well enough for a correct differentiation between species of the same genera (Pérez-Gonzales et al., 2014). Previous studies have shown that some habitats can host different species of fungi and also, different genetic groups within these species (Meyling et al., 2009). In this way, the use of more reliable and sensitive methods such as, molecular techniques can ensure the correct differentiation of the EF candidates to be used in a tick biological control program. This information could help to characterize potential EF strains in order to perform a better control of *R. microplus*.

This work is important due to necessity to find methods that help to control ticks on areas in where chemical acaricides are ineffective. When this last happens, ranchers apply big doses of chemicals, contaminating soils, aquifers and intoxicated cattle. On the other hand, entomopathogenic fungi are susceptible to temperature and UV rays which are high in tropics; using natives microorganism and adapted to this regions, might be improve the levels of mortality against ticks.

Therefore, the objectives of the present study were: i) to isolate *Beauveria bassiana* strains from cattle farms soils, ii) to analyze the phylogenetic relationships among the isolated fungi strains, and iii) to determine the acaricidal effect of *B. bassiana* isolates on *Rhipicephalus microplus* engorged ticks, resistant or susceptible to chemical acaricides.

MATERIAL AND METHODS

Study area

Twelve different regional municipalities from the center-north zone of the State of Veracruz, México, which have a high livestock activity and a high presence of *R. microplus* and *Amblyomma cajennense* ticks, were selected for soil sampling. In each municipality, six cattle farms were selected for convenience, according to the following inclusion criteria: (1) the distance among cattle farms had to be equal or higher than 20 kilometers, (2) the presence of a high tick incidence, and (3) owner's consent for sampling.

Soil sampling from cattle farms

Sampling of the soils was carried out during the period of January-November, 2013. In each cattle farm, three soil samples were obtained from different areas inside the farm: paddocks, hedgerows and pens or cowsheds. From each area, five soil subsamples were collected (200 - 300 g approximately each), homogenized and deposited in properly identified polyethylene bags (INTA, 2000). The sampling system for each area was made according to the following protocols: (1) for the paddocks, the sampling was performed in a "X" form, having 50 meters in distance among the five X points (none of the paddocks exceeded the ten hectares of area) (Rendón, 1994); (2) the sampling on hedgerows was made by establishing transect, where a subsample was taken each 25 meters until 100 meters were covered (Dalglish y Foale, 1998); (3) for the pens, all subsamples were taken in a randomly zigzag way, every 30 steps in distance, until completing the five of them (Pleyser, 1995). All samples were taken with a soil sampler type blast-hole (Lord 0225™) at a depth of 200 mm (INTA, 2000) and 30 mm of diameter, without considering organic matter. Samples were transported in plastic coolers for their protection and maintenance, so they could be treated and analyzed in the Animal Health Laboratory of the Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT-FMVZ-UNAM).

Isolation of entomopathogenic fungi from soil samples

The *Galleria mellonella* bait method was used for the EF isolation from soils samples (Zimmerman, 1986). Briefly, each soil sample was moistened with distilled water and then passed through a 2 mm sieve in order to remove rocks, garbage remains and plant roots. Then, 300 grams of sieved soil were deposited in containers, and five third-stage larvae of

Galleria mellonella were placed as bait for the EF. The containers were incubated at 27 ± 2 °C during ten days, and every two days were inverted for promoting the contact between larva and soil. After this time, the *Galleria* larvae were removed from the soil, disinfected with sodium hypochlorite 0.5% for three minutes, washed with distilled water three times, and dried with adsorbent paper. The larvae were deposited individually in Petri dishes (60 x 10 mm) with Whatman # 1 filter papers, and incubated for 10 days at 27 ± 2 °C and 85-95% of relative humidity (RH). Larvae were inspected daily in order to identify signs of mycosis, check the moisture conditions and to discard those larvae infected with bacteria or in a pupa instar phase.

Taxonomical identification, reproduction and conservation of the fungi isolates

When mycosis appeared on the *Galleria* larvae and the conidia cover their bodies, a conidia sample was taken with a bacteriological sterile loop, sowed in potato dextrose agar (PDA) amended with 0.1 g/L of streptomycin and 0.5 g/L of oxytetracycline, and incubated at 27 ± 2 °C for 21 days. Larvae of *Galleria* infected with opportunistic fungi were discarded. Taxonomic identification was conducted based on the morphological characteristics of the reproductive structures, form and size of the conidia, and growth characteristics according to taxonomical keys (Humbert, 1996). Monosporic cultures were prepared on PDA plates, using 21 day-old conidia of putative EF. After obtaining the monosporic cultures, EF were identified again and sowed on inclined PDA tubes for purification. Finally, after 21 days of growth, the conidia were collected by scraping in distilled water with 15% of glycerol, where 1 ml was deposited in cryotubes and stored at -80 °C.

Molecular identification of entomopathogenic fungi

Each strain from the collection was sowed on PDA at 28 °C, until the mycelium appeared. DNA from the mycelium was obtained according to the technique described by Hoffman and Winston (Hoffman and Winston, 1987). The DNA concentration was estimated using a NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA), and stored at 4°C until it was required.

The internal transcription sequences (ITS) from ribosome genes were amplified by PCR using a thermocycler Bio-Rad T 100 JB Lab, with the universal primers ITS1 (5` TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3`) and ITS4 (5` TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3`) (White et al., 1990); which amplified a 550 bp fragment, including the partial sequence of the 18S subunit, ITS1, 5.8S subunit, ITS2, and the partial sequence of the 28S subunit from ribosomal DNA.

The mixtures for the PCR reactions were prepared in 0.2-mL Eppendorf tubes in a final volume of 12.5 µl. Each reaction contained 0.25 µl of each primer (Sigma-Aldrich®), 0.625 µl of MgCl₂, 0.2 µl of dNTPs (Invitrogen™), 0.15 µl of Taq polymerase (Amplificasa®, BioTecmol, México), 1.25 µl of 10X PCR reaction buffer, 1 µl of DNA and 8.77 µl of sterile-distilled water. Thermal cycling was performed according to the following scheme: one initial denaturalization cycle of 94°C for 5 min, then 38 cycles (denaturalization: 94°C for 30 seconds; annealing: 56°C for 30 seconds; extension: 72°C for one min), and one final extension cycle at 72°C for 5 min. PCR products were visualized on 1% agarose gels in 1X TAE. A GelPilot® 100 bp size marker was used; gels were stained with ethidium bromide (0.1 µg mL⁻¹) and visualized under UV light using a photo-documenter machine. All PCR products were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. The 5.8s DNA region amplified was sequenced by Sanger's method and capillary technology with systems ABI3730 X1 at the Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), CINVESTAV, Irapuato, Guanajuato Mexico). Sequences obtained from fungi strains were alignment using Blast program of GenBank with the goal of determine homology percentages with species previously reported.

Growth of *Beauveria bassiana* strains for the *in vitro* bioassays

The isolated *B. bassiana* strains were grown on 1% of a PDA yeast extract in test-tubes which had 500 ppm of chloramphenicol (Sneh, 1991). Cultures were incubated at 25 ± 1 °C and 80% of RH for 3 weeks. Conidia were harvested by scraping and suspended in sterile distilled water containing 0.1% (v / v) of Tween 80. Then, the suspension was poured into a sterile glass test-tube and homogenized using a vortex mixer. Conidial concentrations were

determined by direct counts using an improved Neubauer haemocytometer and adjusted to 1×10^8 conidia/ml by dilution, with 0.1% (v / v) of Tween 80 in distilled water. Conidia viability was determined by placing 100 μ l of the conidial suspensions on PDA and counting colonies after 24 - 48 h of incubation (Alves, 1998). For each strain, conidia viability needed to have at least 98% in order to be considered.

Collecting the ticks

Four free-tick male calves (3/4 Holstein x 1/4 Zebu) were maintained in individual pens for artificial infestation. Two calves were infested with 5000 larvae of *R. microplus* susceptible to acaricides (Media Joya strain), whereas the other two were infested with the same number of larvae of *R. microplus*, but resistant to acaricides (CLAR strain). Tick infestations were performed every 15 days (three times). The susceptible tick strain was obtained from the Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA), which is recommended by the FAO as a reference strain for Latin America. On the other hand, the acaricide resistant tick strain was obtained from a cattle farm in the municipality of Martínez de la Torre, Veracruz, Mexico. The CLAR strain was determined to be multiresistant to commercial acaricides (organophosphates, pyrethroids and amidines) and endectocides (ivermectin) (Fernández-Salas et al., 2012a, b). Engorged female ticks were collected after 19 to 21 days of post-infestation, directly from the holding pen floors and transported immediately to the laboratory. Upon arrival, ticks were disinfected with 1% of sodium hypochlorite and washed three times with distilled water; then, they were dried with sterile adsorbent paper and used immediately in the adult bioassays.

The management and care of the calves was approved by the Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (SICUAE), a FMVZ-UNAM program, DC-2013-14 protocol number.

Acaricidal evaluation of *Beauveria bassiana*

The acaricidal effect of *B. bassiana* strains on engorged female ticks was evaluated using the adult immersion test (Drummond et al., 1967). Conidia suspensions for each *B. bassiana* strain were prepared (1×10^8 conidia/ml), and ten engorged female ticks ranging

from 0.2 to 0.3 g were treated with the conidia. The control group (ten ticks) was exposed only to distilled water and Tween 80. Three repetitions for each treatment were performed. Treated groups were immersed in the conidial concentration or control group for one minute, and then dried by placing them on paper towels. Ticks from each group were adhered to masking tape strips in Petri dishes, incubated at 27 ± 1.5 °C and 70 – 80% of RH, in order to allow tick oviposition and to allow the fungi to produce its acaricidal effect. Ticks were individually examined under a stereoscopic microscope for detecting fungal infections and mortality was recorded every 2 post-treatment days (PT), during a total period of 20 days. Ticks were considered dead if there was an absence of movement after stimulation, a movement cessation of the malpighian tube, and by the observation of mycelia emerging from the cuticle. Mortality was calculated using the corrected formula (Abott, 1925) recommended by the Food and Agriculture Organization.

The effect on the reproductive efficiency index (REI) was evaluated ten days PT. The egg mass from each tick was collected and weighed using an analytical scale. After weighing, eggs were deposited into glass vials (10 ml) with cotton plugs and incubated in order to allow egg hatching, and also for evaluating the possible residual effects of EF during egg hatching. After 21 days, the hatching rates for the different treatments were estimated by counting eggshells. Each bioassay was repeated once on a different day, and the reported results corresponded to the averages of both repetitions.

Treatment of *Rhipicephalus microplus* with the selected *Beauveria bassiana* strains

Based on the mortality and REI of *R. microplus*, two *B. bassiana* strains (BbV03 and BbV04) were selected to assess the LC₅₀ and LC₉₉. Another series of adult immersion tests with engorged females, using the CLAR strain (the Media Joya strain was no longer used because there was no difference in mortality among tick populations) was performed at concentrations of 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 and 1×10^5 conidia/ml. Bioassays were performed under the same aforementioned conditions. A mortality analysis between the four concentrations was performed on day 20. The mortality of the control group was lower than 10%.

Statistical analysis

Treatment effects on adult mortality and egg hatching inhibition were analyzed using a Kruskal – Wallis test. The reproductive efficiency index (REI = egg mass weight / initial weight of the engorged female) was determined for each engorged female tick. A single ANOVA factor was used to determine the statistical differences of susceptibility among tick populations and REI. Calculation of LC₅₀ and LC₉₉ was performed using a probit analysis. A *P* value of < 0.05 was considered significant.

The sequences obtained from fungi DNA were edited and assembled using the BioEdit program (Hall, 1999). Multiple sequence alignments were made using the Clustal W program (Thompson et al., 1994). Maximum parsimony (MP) analyses and the phylogenetic tree of the strains were performed with the Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) software 5.0 (Tamura et al., 2013), using the close-neighbor-interchange algorithm. Branch robustness was estimated by bootstrap analysis with 1000 sampling repetitions of the data. Sequences were aligned using the GenBank Blast program in order to determine homology percentages with previously reported species, and to confirm their identity.

Results

The entomopathogenic fungi isolated were identified as *Beauveria bassiana* and we found that our six *B. bassiana* strains were clustered into the same clade with other previously reported *B. bassiana* strains; however, they were separated into three different sub-clades in the phylogenetic tree (two isolates each) (Figure 1).

The mortality percentages for the six *B. bassiana* isolates on resistant or susceptible strains of *R. microplus* engorged females are presented in Table I. BbV03 and BbV04 showed the highest acaricidal effect against *R. microplus*.

In reproductive parameters; the BbV03 strain reduced the egg-laying significantly followed by BbV04 against resistant and susceptible ticks (Table II). None of the fungal strains had any significant residual effects on the egg hatching inhibition of *R. microplus* (*P*>0.05).

There were no differences of the effect of *B. bassiana* strains between the *R. microplus* populations tested ($P>0.05$; Table III).

The BbV03 strain showed the strongest dose-effect relationship against *R. microplus* (Table IV).

Discussion

In this study, six different strains of *Beauveria bassiana* were isolated from soils (BbV01, BbV02, BbV03, BbV04, BbV05 and BbV06) in cattle farms. Until now, there are few reports concerning EF isolations from paddocks (Yip et al., 1992). In most studies, EF have been isolated from tick or insect corpses that were found inside the paddocks (da Costa et al., 2001). The isolation of EF from cattle farm soils allows knowing the composition of the fungal community in this ecosystem. In this way, the successful use of the EF as biocontrol agents in tropical environments, needs a better understanding of the ecology and composition of the indigenous populations (Pérez-Gonzales et al., 2014). Thus, the presence of EF in paddocks might highlight their ecological importance, due to their capability of colonizing and controlling the different stages of ticks, such as: eggs, larvae, nymphs and adults (Fernandes and Bittencourt, 2008). The EF might keep the plagues under relative control; otherwise, without this natural control system, the plagues might cause serious damages to plants, crops and domestic or wild animals (Di Barbaro et al., 2009). Therefore, our results contribute to the knowledge regarding the presence of EF in cattle farm soils, which could trigger the beginning of several conservation measures of EF in these important ecosystems, and also could start the creation of new strategy designs for highly effective EF isolations in order to combat ticks.

In this study, the isolated EF were identified as *Beauveria bassiana*. Our findings agree with previous studies, where *B. bassiana* was reported to be one of the principal EF isolated from soils (Asencio et al., 2003) and that this species has been reported as one of the most important biological controls for ticks (Jonsson, 2004). The precise identification of these microorganisms is needed in order to differentiate among species, due to the similarity that exists between pathogen and non-pathogen microorganisms for mammals. Also, it is important for establishing the reproductive characteristics or temperature and

humidity requirements, and for predicting virulence profiles against plagues (Bishoff et al., 2009; Rehner et al., 2011). Indeed, an important path of knowledge corresponds to the genetic interrelationships between fungal species. Meyling et al. (2009) demonstrated that a particular habitat might host different species and distinct genetic groups within the same species, as well. The boundaries between species in the EF genera are based only in morphological studies; nevertheless, genetic analyses are necessary in order to establish clear relationships between species. The analysis of the phylogenetic relationships revealed any genetic distance between the members of the *B. bassiana* isolates and also, the presence of three probable phylogenetic lineages (Figure 1). This finding suggests that in cattle farm soils, there is probably a genetic complexity in the species of *B. bassiana* fungi. Neelapu et al. (Neelapu et al., 2009) demonstrate that the *B. bassiana* complex varies narrowly in the different lineages and shows a clear phylogenetic separation. Probably, we found three different sub-species of *B. bassiana*, but unfortunately the differentiation at sub-species level was not possible to obtain in this study, due to the molecular technique used.

In terms of mortality, similar results (82.29 % to 86.54 %) were reported for *R. microplus* engorged females using four *B. bassiana* isolates, nonetheless the authors applied a higher dose of conidia (1×10^9 conidia/ml) (Campos et al., 2010). Paião et al. (2001) reported a mortality mean of 88.7%, when using five *B. bassiana* strains at 1×10^8 conidia/ml and Sun et al. (2013) obtained a 100% of mortality against *R. microplus* after treatment with *B. bassiana* (B.bAT17 strain) on the 10th day. Nevertheless, other results reported non-significant mortality effects when using a *B. bassiana* (Bb986) strain on *R. microplus* (Camargo et al., 2012). Differences among studies could be attributed to the virulence and pathogenicity of each *B. bassiana* strain, isolated from different environments and hosts; fungal virulence varies depending on its ability to penetrate the insect cuticle, which is related with the toxin and/or enzyme production and with the *appresoria* formation. Also, this variation could be due to the interaction of several factors inherent to ticks, such as their immunological defense (Anderson et al., 2011). Moreover, fungi might lose their virulence or pathogenicity because of the constant propagation or management on artificial media. It has been reported that *B. bassiana* has different metabolic responses depending, whether it is grown on pupal extracts or root exudates (Luo

et al., 2005). Indeed, it has been hypothesized that an isolate may focus its energy into the vegetative growth, instead of producing a large amount of toxins in some situations of nutrient's availability (Kershaw et al., 1994). The fungi evaluated in the present study were recently isolated from cattle farms, so their reproduction on artificial media was low. Indeed, these fungi are native to pastures where they co-habit with *R. microplus* ticks, giving them -probably- a better capacity to colonize and kill ticks. Although the evaluated strains did not reach a 100% of mortality, our results are encouraging because *B. bassiana* strains are generally less pathogenic against ticks than other EF (Gindin et al., 2002). Moreover, we observed that a nearly 90% of the infected ticks were covered with mycelia and allowed the *B. bassiana* sporulation (data not shown). At the field level, tick bodies showing sporulation may serve as reservoirs or vectors of fungal conidia, permitting the fungi to be transmitted from an infected tick to susceptible ones, under different stages of development.

The effect of *B. bassiana* strains on the engorged female reproduction (egg laying and egg hatching) could help to decrease tick populations in pastures. Perinotto et al. (2012) and Sun et al. (2013) reported similar fungal effects using *B. bassiana* strains on the egg laying of *R. microplus*. Other studies have shown a higher egg laying reduction (Campos et al., 2010; Sun et al., 2013). However, Camargo et al. (2012) and Paião et al. (2001) did not find any inhibitory effects on the *R. microplus* oviposition using some *B. bassiana* isolates. The variation of *B. bassiana* effects on the reproductive parameters of *R. microplus* is highly related to their capacity of killing the ticks quickly. Each fungal strain has a different timing for tick termination, where the growth kinetics and toxin production are two of the main factors influencing this difference (Clarkson and Charnley, 1996). The virulence of a fungal strain may reduce the *R. microplus* growth rates in grasslands that are used for cattle grazing. An engorged female of *R. microplus*, can oviposit between 2500 – 3500 eggs (Davey et al., 2006) thus, an inhibition of 25% to 35% (obtained with BbV04 and BbV03), will reduced about 750 – 1050 eggs per tick, implicating a larval diminish in grasslands. Also, the residual effects from EF can still working against egg hatching in order to reduce tick populations in the field, nevertheless in this study, none of the fungal strains had any significant residual effects on the egg hatching inhibition of *R. microplus*. Most likely, the

inhibitory effect of EF against hatchability is more effective under field conditions, since the eggs are not removed from the infected engorged females (contrary to bioassays), allowing the conidia to be transmitted directly to them.

On the other hand, the acaricidal effect of *B. bassiana* isolates, between two populations of *R. microplus* (resistant or susceptible to chemical acaricides), was compared. Some reports similar to this study did not find any mortality differences between susceptible and resistant tick populations that were treated with *M. anisopliae* or with *B. bassiana* strains (Fernández-Ruvalcaba et al., 2005). Other studies did not report any mortalities in a resistant population of *R. microplus* (Bahiense et al., 2008). Our results suggest that the resistance mechanism used by ticks in order to avoid the toxic effects of chemical acaricides did not affect the infective mechanisms of the *B. bassiana* tested strains. The form in which the EF kill the ticks is really diverse (Tellez-Jurado et al., 2009), suggesting that the resistance to biological control agents is less likely to occur, than in those observed for chemical acaricides. This lower probability for developing resistance and the virulence knowledge of the EF will help to justify and design new control strategies for resistant ticks under field conditions, using fungi as the main control agents.

Regarding virulence, we determined the LC_{50} and LC_{99} of the BbV03 and BbV04 strains, since both showed higher acaricidal effects in terms of mortality and egg laying inhibition on *R. microplus* engorged females. In previous studies, where the EF were used against *R. microplus*, the LC_{50} values had been calculated (Campos et al., 2010; Sun et al., 2013); however, until now, there are no studies concerning LC_{99} . The determination of LC_{50} as a unique parameter of infectivity could result in a high variability of the acaricidal effect (Fernández-Ruvalcaba et al., 2005), while the analysis of an LC_{99} estimate could be an important indicator of the real virulence of the EF strains. Thus, our LC_{50} and LC_{99} data showed dose-dependent acaricidal effects of BbV03 and BbV04 within acceptable virulence degrees. Also, these results allow determining the correct dosages for the BbV03 and BbV04 strains during field acaricidal evaluations, using natural infestations. Nevertheless, more research is still required in order to develop effective formulations for tick control on the field.

In conclusion, these results showed that *B. bassiana* is present in the pastures of tropic cattle farms and that probably there are genetic variations between members of the *bassiana* species, amplifying the opportunities to find an organism highly pathogen to ticks. BbV03 and BbV04 strains have acaricidal effects against *R. microplus* resistant or susceptible to chemicals, so they may be considered as promising co-adjuvants for controlling *R. microplus* field populations without consider its toxicological behavior.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Mexico (CONACyT) for supporting Agustín Fernández-Salas during his PhD program at FMVZ-UNAM.

LITERATURE CITED

Fernández-Salas, A., M. A. Alonso-Díaz, R. Acosta-Rodríguez, J. F. Torres-Acosta, C. Sandoval-Castro, and R. I. Rodríguez-Vivas. 2011. *In vitro* acaricidal effect of tannin-rich plants against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* **175**: 113-118.

Samish, M., H. Ginsberg, and I. Glazer. 2004. Biological control of ticks. *Parasitology* **129**: 389-403.

Paião, J. C. V., A. C. Monteiro, and S. N. Kronka. 2001. Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **17**: 245-251.

Perinotto, W. M. S., I. C. Angelo, P. S. Golo, S. Quinelato, M. G. Camargo, F. A. Sá, and V. R. E. P. Bittencourt. 2012. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. *Experimental Parasitology* **130**: 267-270.

- Sun, M., Q. Ren, G. Guan, Y. Li, X. Han, C. Ma, H. Yin, and J. Luo. 2013. Effectiveness of *Beauveria bassiana* [*sensu lato*] strains for biological control against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in China. *Parasitology International* **62**: 412-415.
- Leemon, D. M., L. B. Turner, and N. N. Jonsson. 2008. Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Veterinary Parasitology* **156**: 248-260.
- Rangel, D. E. N., G. U. L. Braga, A. J. Anderson, and D. W. Roberts. 2005. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *Journal of Invertebrate Pathology* **88**: 116-125.
- Fernandes, É. K. K., and V. R. E. P. Bittencourt. 2008. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Experimental and Applied Acarology* **46**: 71-93.
- Feng, M. G., T. J. Poprawski, and G. G. Khachatourians. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology* **4**: 3-34.
- Pérez-González, V. H., A. W. Guzmán-Franco, R. Alatorre-Rosas, J. Hernández-López, A. Hernández-López, M. G. Carrillo-Benítez, and J. Baverstock. 2014. Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. *Journal of Invertebrate Pathology* **119**: 54-61.
- Meyling, N.V., M. Lübeck, E. P. Buckley, J. Eilenberg, and S. A. Rehner. 2009. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Molecular Ecology* **18**: 1282-1293.

INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). 2000. Técnicas de toma y remisión de muestras de suelos. Ediciones: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. http://inta.gob.ar/sites/default/files/script_tmp_tecnicas_de_toma_y_remisin_de_muestras_de_suelos.pdf. Accessed 12 Jan 2017.

Rendón, S.G. 1994. Muestreo: Aplicación en la estimación simultanea de varios parámetros. Departamento de Parasitología Agrícola. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México, 246 p.

Dalglish, N. P., and M. A. Foale. 1998. Soil matters-Monitoring soil water and nutrients in dryland farming systems (CSIRO/Agricultural Production Systems Research Unit: Technical Manual ISBN 0 643 06375 7). https://www.researchgate.net/publication/270893475_Soil_matters_Monitoring_soil_water_and_nutrients_in_dry_land_farming. Accessed 23 Jan 2017.

Pleysier, J.L. 1995. Soil sampling and sample preparation. Vol 2. International Institute of Tropical Agriculture, p. 27.

Zimmermann, G. 1986. The *Galleria* bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology* **102**: 213–215.

Humbert, R. 1996. Fungi Identification. Manual of techniques in insect pathology. USDA-ARS Plant Protection Research. Ithaca NY. Chapter V-1. p. 153–185.

Hoffman, C.S., and F. Winston. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* PCR Protocols: a guide to methods and

applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (eds.). Academic Press. p. 315-322.

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

Alves, S. B. 1998. *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba: FEALQ. 1163 p.

Fernández-Salas, A., M. A. Alonso-Díaz, R. I. Rodríguez-Vivas, and H. Basurto-Camberos. 2012a. Ivermectin resistance status and factors associated in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) populations from Veracruz, Mexico. *Veterinary Parasitology* **190**: 210-215.

Fernández-Salas, A., R. I. Rodríguez-Vivas, and M. A. Alonso-Díaz. 2012b. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multiresistant to acaricides and macrocyclic lactones in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology* **183**: 338-342.

Drummond, R.O., O. H. Graham, S. E. Ernst, and J. L. Trevino. 1967. Evaluation of insecticides for the control of *Boophilus annulatus* (Say) and *B. microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae) on cattle. *Proceedings, 2nd International Congress of Acarology*. Bonington, England, p. 493-498.

Abott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* **18**: 265-267.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* [London]: Information Retrieval Ltd **41**: 95-98.

Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725-2729.

Yip, H.Y., A. C. Rath and T. B. Koen. 1992. Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabaeidae: *Adoryphorus couloni*). *Mycological Research* **96**: 92-96.

da Costa, G. L., M. I. M. Sarquis, A. M. L. de Moraes, and V. R. E. P. Bittencourt. 2001. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia* **154**: 207-209.

Di Barbaro, G., S. Pernasetti, and M. Jorratti. 2009. ¿Qué son y qué roll juegan los microorganismos en el ambiente y en la fertilidad de los suelos? *Revista de Divulgación Técnica, Agrícola y Agroindustrial*. **3**: 1-7.

Asencio, L., T. Carbonell, J. A. López-Jiménez, and L. V. Lopez-Llorca. 2003. Entomopathogenic fungi in soils from Alicante province. *Spanish Journal of Agricultural Research*. **1**: 37-45.

Jonsson, N. N. 2004. Integrated control programme for ticks: an examination of some possible components. *FAO Animal Production and Health Paper*. Approaches to the control of ticks, p. 78.

Bischoff, J.F., S. A. Rehner, and R. A. Humber. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* **101**: 512–530.

Rehner, S.A., A. M. Minnis, G. H. Sung, J. J. Luangsa-ard, L. Devetto, R. A. Humber. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* **103**: 1055–1073.

Neelapu, N.R., A. Reineke, U. M. Chanchala, and U.D. Koduru. 2009. Molecular phylogeny of asexual entomopathogenic fungi with special reference to *Beauveria bassiana* and *Nomuraea rileyi*. *Revista Iberoamericana de Micología* **26**: 129-145.

Campos, R. A., J. T. Boldo, I. C. Pimentel, V. Dalfovo, W. L. Araújo, J. L. Azevedo, M. H. Vainstein, and N. M. Barros. 2010. Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* spp. to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Genetics and Molecular Research* **9**: 1421-1430.

Camargo, M. G., P. S. Golo, I. C. Angelo, W. M. S. Perinotto, F. A. Sá, S. Quinelato, and V. R. E. P. Bittencourt. 2012. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. *Veterinary Parasitology* **188**: 140-147.

Anderson, R.D., A. S. Bell, S. Blanford, K. P. Paaijmans, and M. B. Thomas. 2011. Comparative growth kinetics and virulence of four different isolates of entomopathogenic fungi in the house fly (*Musca domestica* L.). *Journal of Invertebrate Pathology* **107**: 179-184.

Luo, F., Q. Wang, C. Yin, Y. Ge, F. Hu, H. Bo, H. Zhuo, G. Bao, B. Wang, R. Lu, and Z. Li. 2015. Differential metabolic responses of *Beauveria bassiana* cultured in pupae extracts, root exudates and its interactions with insect and plant. *Journal of Invertebrate Pathology* **130**: 154-164.

- Kershaw, M. J., E. R. Moorhouse, R. Bateman, S. E. Reynolds, and A. K. Charnley. 1994. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insects. *Journal of Invertebrate Pathology* **74**: 213-223.
- Gindin, G., M. Samish, G. Zangi, A. Mishoutchenko, and I. Glazer. The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. *Experimental and Applied Acarology* **28**: 283-288.
- Clarkson, J. M., and A. K. Charnley. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology* **4**: 197-203.
- Davey, R. B., J. E. George, and R. J. Miller. 2006. Comparison of the reproductive biology between acaricides-resistant and acaricide-susceptible *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* **139**: 211-220.
- Fernández-Ruvalcaba, M., E. Zhioua, and V. García-Vázquez. 2005. Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Boophilus microplus* sensible y resistente a los organofosforados. *Técnica Pecuaria México* **43**: 433-440.
- Bahiense, T.C., E. K. K. Fernandes, J. C. Angelo, W. M. S. Perinotto, and V. R. E. P. Bittencourt. Performance of *Metarhizium anisopliae* and its combination with Deltamethrin against a pyrethroid-resistant strain of *Boophilus microplus* in a stall test. *Annals of the New York Academic of Science* **1149**: 242-245.
- Téllez-Jurado, A., M. G. Cruz-Ramírez, Y. Mercado-Flores, A. Asaff-Torres, A. Arana-Cuenca. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología* **30**: 73-80.

Figure 1. Phylogenetic relationship of *Beauveria bassiana* from cattle farm soils with other isolates from Mexico and other countries.

Footnote

**Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Martínez de la Torre, Veracruz, México.*

†*Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.*

‡*Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México.*

§*Unidad de Microbiología Básica y Aplicada, Campus Aeropuerto, Universidad Autónoma de Querétaro, Qro. México.*

Table I. Mortality index for six *Beauveria bassiana* isolates on resistant or susceptible strains of *Rhipicephalus microplus*

Strain	Days post-treatment															
	Mean mortality %															
	6		8		10		12		14		16		18		20	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
Control	0	0	0	0	0	3.3	0	3.3	3.3	3.3	6.7	3.3	6.7	3.3	6.7	6.7
BbV01	0	0	0	0	0	0	3.3	0	10	6.7	13.3	6.7	16.7	6.7	23.3	13.3
BbV02	0	0	0	0	0	0	0	0	3.3	0	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3
BbV03	3.3	3.3	10	16.7	26.7	23.3	36.7	30	43.3	40	60	46.7	83.3	56.7	86.7	60
BbV04	6.7	0	6.7	10	23.3	16.7	26.7	30	40	36.7	63.3	40	63.3	46.7	66.7	53.3
BbV05	6.7	0	10	6.7	13.3	13.3	26.7	16.7	30	16.7	30	26.7	33.3	30	33.3	36.7
BbV06	0	0	0	3.3	6.7	3.3	10	10	16.7	13.3	16.7	16.7	16.7	20	20	20

R: resistant; S: susceptible. Mortality rates were adjusted according to control group.

Table II. Reproductive efficiency index (in grams) of *Rhipicephalus microplus* engorged females treated with *Beauveria bassiana*.

Strains	Control group*	Resistant ticks*	Difference to control group	Reduction %	Susceptible ticks*	Difference to control group	Reduction %
BbV01	0.58783 ^a	0.57303 ^a	0.015	2.55	0.58231 ^a	0.005	0.85
BbV02	0.58783 ^a	0.59034 ^a	0.0	0.0	0.57993 ^a	0.007	1.19
BbV03	0.52074 ^a	0.32177 ^b	0.199	38.2	0.34455 ^b	0.176	33.8
BbV04	0.52074 ^a	0.39039 ^b	0.130	25.0	0.38923 ^b	0.131	25.16
BbV05	0.52074 ^a	0.50790 ^a	0.013	2.5	0.49871 ^a	0.022	4.22
BbV06	0.52074 ^a	0.52675 ^a	0.0	0.0	0.51003 ^a	0.010	1.9

* Different letters between columns indicates a significant statistical difference (P < 0.05).

Table III. Mortality effect of *Beauveria bassiana* on *Rhipicephalus microplus* ticks susceptible or resistant on day 20 post-exposure.

Strains	Mortality of resistant tick strain (%)	Mortality of susceptible tick strain (%)	<i>P</i> -value	Most susceptible tick strain to <i>B. bassiana</i>
BbV01	23.3	13.3	0.0806	No difference
BbV02	3.3	3.3	-	No difference
BbV03	86.7	60.0	0.0081	Resistant ticks
BbV04	66.7	53.3	0.0711	No difference
BbV05	33.3	36.7	0.3739	No difference
BbV06	20.0	20.0	-	No difference

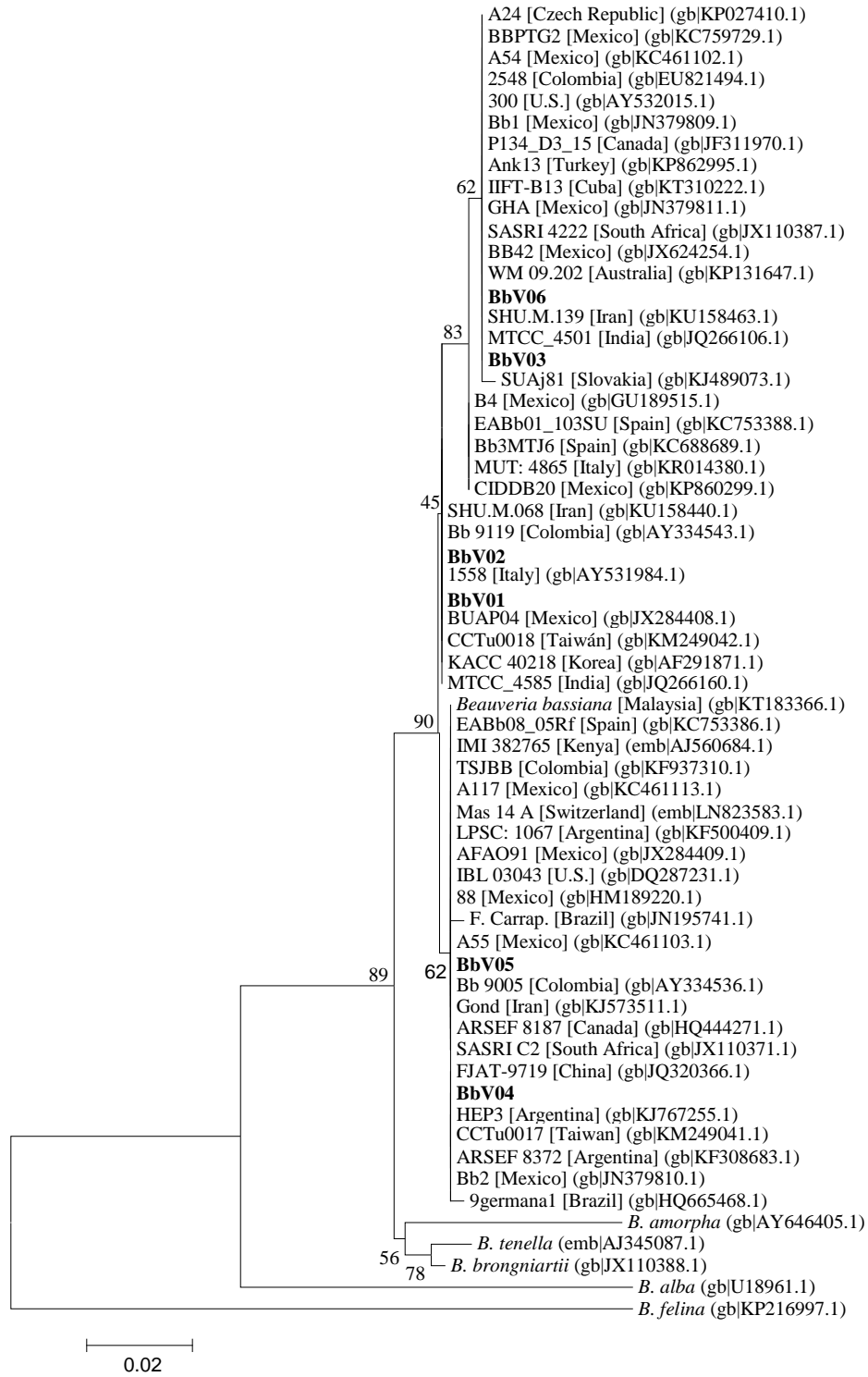
P < 0.05 was considered significant. - = no calculated.

Table IV. Lethal concentration 50% and 99% of two *Beauveria bassiana* strains on *Rhipicephalus microplus* ticks resistant to acaricides.

Strains	Doses	Days PT										slope	LC ₅₀ (95% CI)	LC ₉₉ (95% CI)
		Mortality (%)												
BbV03	1x10 ⁸	0	3.3	10	26.7	36.7	43.3	60.0	83.3	86.7	1.51	(5x10 ⁶ -4x10 ⁷)	(2x10 ⁸ -∞)	
	1x10 ⁷	0	0	0	6.7	16.7	20	30	33.3	36.7				
	1x10 ⁶	0	0	0	0	0	6.7	13.3	13.3	16.7				
	1x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	3.3	3.3	10				
	0	0	0	0	0	0	3.3	6.7	6.7	6.7				
BbV04	1x10 ⁸	0	6.7	6.7	23.3	26.7	40	63.3	63.3	66.7	0.67	(1x10 ⁷ -2x10 ⁸)	(7x10 ⁹ -∞)	
	1x10 ⁷	0	0	0	6.7	13.3	13.3	16.7	23.3	26.7				
	1x10 ⁶	0	0	0	0	0	3.3	3.3	10	13.3				
	1x10 ⁵	0	0	0	0	0	3.3	6.7	6.7	6.7				
	0	0	0	0	0	0	3.3	6.7	6.7	6.7				

PT: post-treatment; LC: lethal concentration; CI: confidence interval. ∞ = no calculated.

Figure 1.



2
3 **Phylogenetic relationships and acaricidal effects of *Beauveria bassiana* obtained from**
4 **cattle farm soils against *Rhipicephalus microplus***

5
6 **Agustín Fernández-Salas, Miguel Ángel Alonso-Díaz*, Rogelio Alejandro Alonso**
7 **Morales†, Roberto Lezama-Gutiérrez‡, José Antonio Cervantes-Chávez§**

8
9 *Facultad de Ingeniería Agronómica y Zootecnia, Complejo Regional Centro, Benemérita*
10 *Universidad Autónoma de Puebla, Carretera Cañada – Morelos Km. 7.5. El Salado,*
11 *Tecamachalco, Puebla, México. Correspondence should be sent to: alonsodm@unam.mx*

12
13 **ABSTRACT:** The objectives of the present study were to isolate *Beauveria bassiana*
14 strains from cattle farms soils, to analyze the phylogenetic relationships among the isolated
15 fungi strains, and to determine the acaricidal effect of *B. bassiana* isolates on *Rhipicephalus*
16 *microplus* engorged ticks, resistant or susceptible to chemical acaricides. Six strains of
17 *Beauveria bassiana* were obtained and isolated from cattle farms soils by *Galleria* bait
18 method in Mexican tropics and the acaricidal effect was assessed against two populations
19 of *R. microplus* (resistant or susceptible to chemical acaricides) using the adult immersion
20 test. The BbV03 strain produced an 86.7% and a 60% of mortality on resistant and
21 susceptible ticks, respectively; whereas the mortality scored with the BbV04 strain was
22 66.7% and 53.5% on resistant and susceptible ticks, respectively. The BbV03 and BbV04
23 strains reduced egg-laying on both *R. microplus* populations. There were not statistical
24 differences in the acaricidal effect of *B. bassiana* strains, between the *R. microplus*
25 susceptible or resistant populations ($P > 0.05$). The BbV03 strain was the most virulent
26 against *R. microplus* with a LC_{50} of 2×10^7 and a LC_{99} of 7×10^8 conidia/ml. We found that
27 the six *B. bassiana* isolated were clustered into the same clade with other previously
28 reported *B. bassiana* strains (from GenBank); however, they were separated into three
29 different sub-clades. This study shows that some *B. bassiana* strains might be a promising
30 coadjuvant alternative for biological tick control, including those that are resistant to
31 chemical acaricides. *B. bassiana* is present in the pastures of tropic cattle farms and there

32 are genetic variations between members of the *bassiana* specie that living in this
33 ecosystem. This last showed that *Beauveria bassiana* might play an important roll in the
34 natural control of *R. microplus* at paddocks of cattle farms.

35 *Rhipicephalus microplus* (Canestrini 1888) is considered one of the most important ticks,
36 due to the transmission of pathogenic agents, the costs involved in treatment schemes and
37 the growing populations of ticks resistant to acaricides (Fernández-Salas et al., 2011). The
38 resistance phenomenon observed in *R. microplus*, coupled with the environmental
39 contamination by secondary chemical metabolites, has motivated to open an investigation
40 on new alternative tick control methods (Samish et al., 2004), such as the use of
41 entomopathogenic fungi (EF).

42 The acaricidal effect of EF against *R. microplus* is high when it is evaluated *in vitro*
43 (Paião et al., 2001; Perinotto et al., 2012; Sun et al., 2013); however, under tropical field
44 conditions, this effect is usually reduced (Leemon et al., 2008). The evolutionary climatic
45 adaptation of isolated EF in tropical areas might be an important positive factor in their
46 efficacy against the ticks that are present in those environments, considering that foreign
47 organisms might be most susceptible to extreme climatic factors than native fungi,
48 particularly for temperature and UV-rays (Rangel et al., 2005). The soil is the main micro-
49 ecosystem, where a high diversity of microorganisms is cohabiting with each other; so, they
50 have the potential to colonize and kill insects and ticks (Perinotto et al., 2012). Therefore,
51 these organisms (including EF) play an important role in the natural control of tick
52 populations, especially in the paddocks of tropical cattle farms. *Beauveria bassiana*
53 (Balsamo) Vuillemin, 1912, is an important natural tick pathogen (Fernandes and
54 Bittencourt, 2008), and is one of the most studied biological control agents, mainly due to
55 several positive characteristics, such as: (1) its extensive insect host range; (2) its high
56 pathogenicity to target pests; (3) has an easy and inexpensive production; (4) has a rapid
57 growth and abundant sporulation; and (5) is non-pathogenic to the cells of mammals or
58 plants (Feng et al., 1994).

59 Considering the high and complex chemical resistance that has been observed in
60 ticks, it is desirable for the EF to be effective against susceptible and resistant tick
61 populations. Different tick populations might show distinct susceptibility levels to
62 biological control using EF, so the genotypic characteristics are an important factor to be

63 considered as well. Thus, when a tick population is resistant to chemical acaricides, it is
64 inappropriate to neglect the possible interference of the tick resistance mechanism in the EF
65 performance (Perinotto et al., 2012).

66 Moreover, when the EF are isolated in order to be used as biological controls, it is
67 important to identify them correctly. Usually, this identification is carried out only by
68 morphologic and culture traits; however, this might not be well enough for a correct
69 differentiation between species of the same genera (Pérez-Gonzales et al., 2014). Previous
70 studies have shown that some habitats can host different species of fungi and also, different
71 genetic groups within these species (Meyling et al., 2009). In this way, the use of more
72 reliable and sensitive methods such as, molecular techniques can ensure the correct
73 differentiation of the EF candidates to be used in a tick biological control program. This
74 information could help to characterize potential EF strains in order to perform a better
75 control of *R. microplus*.

76 This work is important due to necessity to find methods that help to control ticks on
77 areas in where chemical acaricides are ineffective. When this last happens, ranchers apply
78 big doses of chemicals, contaminating soils, aquifers and intoxicated cattle. On the other
79 hand, entomophatogenic fungi are susceptible to temperature and UV rays which are high
80 in tropics; using natives microorganism and adapted to this regions, might be improve the
81 levels of mortality against ticks.

82 Therefore, the objectives of the present study were: i) to isolate *Beauveria bassiana*
83 strains from cattle farms soils, ii) to analyze the phylogenetic relationships among the
84 isolated fungi strains, and iii) to determine the acaricidal effect of *B. bassiana* isolates on
85 *Rhipicephalus microplus* engorged ticks, resistant or susceptible to chemical acaricides.

86

87 MATERIAL AND METHODS

88 Study area

89 Twelve different regional municipalities from the center-north zone of the State of
90 Veracruz, México, which have a high livestock activity and a high presence of *R. microplus*
91 and *Amblyomma cajennense* ticks, were selected for soil sampling. In each municipality,
92 six cattle farms were selected for convenience, according to the following inclusion criteria:

93 (1) the distance among cattle farms had to be equal or higher than 20 kilometers, (2) the
94 presence of a high tick incidence, and (3) owner's consent for sampling.

95

96 **Soil sampling from cattle farms**

97 Sampling of the soils was carried out during the period of January-November, 2013. In
98 each cattle farm, three soil samples were obtained from different areas inside the farm:
99 paddocks, hedgerows and pens or cowsheds. From each area, five soil subsamples were
100 collected (200 - 300 g approximately each), homogenized and deposited in properly
101 identified polyethylene bags (INTA, 2000). The sampling system for each area was made
102 according to the following protocols: (1) for the paddocks, the sampling was performed in a
103 "X" form, having 50 meters in distance among the five X points (none of the paddocks
104 exceeded the ten hectares of area) (Rendón, 1994); (2) the sampling on hedgerows was
105 made by establishing transect, where a subsample was taken each 25 meters until 100
106 meters were covered (Dalgliesh y Foale, 1998); (3) for the pens, all subsamples were taken
107 in a randomly zigzag way, every 30 steps in distance, until completing the five of them
108 (Pleyser, 1995). All samples were taken with a soil sampler type blast-hole (Lord 0225™)
109 at a depth of 200 mm (INTA, 2000) and 30 mm of diameter, without considering organic
110 matter. Samples were transported in plastic coolers for their protection and maintenance, so
111 they could be treated and analyzed in the Animal Health Laboratory of the Centro de
112 Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT-FMVZ-UNAM).

113

114 **Isolation of entomopathogenic fungi from soil samples**

115 The *Galleria mellonella* bait method was used for the EF isolation from soils samples
116 (Zimmerman, 1986). Briefly, each soil sample was moistened with distilled water and then
117 passed through a 2 mm sieve in order to remove rocks, garbage remains and plant roots.
118 Then, 300 grams of sieved soil were deposited in containers, and five third-stage larvae of
119 *Galleria mellonella* were placed as bait for the EF. The containers were incubated at 27 ± 2
120 °C during ten days, and every two days were inverted for promoting the contact between
121 larva and soil. After this time, the *Galleria* larvae were removed from the soil, disinfected
122 with sodium hypochlorite 0.5% for three minutes, washed with distilled water three times,
123 and dried with adsorbent paper. The larvae were deposited individually in Petri dishes (60 x

124 10 mm) with Whatman # 1 filter papers, and incubated for 10 days at 27 ± 2 °C and 85-
125 95% of relative humidity (RH). Larvae were inspected daily in order to identify signs of
126 mycosis, check the moisture conditions and to discard those larvae infected with bacteria or
127 in a pupa instar phase.

128

129 **Taxonomical identification, reproduction and conservation of the fungi isolates**

130 When mycosis appeared on the *Galleria* larvae and the conidia cover their bodies, a conidia
131 sample was taken with a bacteriological sterile loop, sowed in potato dextrose agar (PDA)
132 amended with 0.1 g/L of streptomycin and 0.5 g/L of oxytetracycline, and incubated at 27
133 ± 2 °C for 21 days. Larvae of *Galleria* infected with opportunistic fungi were discarded.
134 Taxonomic identification was conducted based on the morphological characteristics of the
135 reproductive structures, form and size of the conidia, and growth characteristics according
136 to taxonomical keys (Humbert, 1996). Monosporic cultures were prepared on PDA plates,
137 using 21 day-old conidia of putative EF. After obtaining the monosporic cultures, EF were
138 identified again and sowed on inclined PDA tubes for purification. Finally, after 21 days of
139 growth, the conidia were collected by scraping in distilled water with 15% of glycerol,
140 where 1 ml was deposited in cryotubes and stored at -80 °C.

141

142 **Molecular identification of entomopathogenic fungi**

143 Each strain from the collection was sowed on PDA at 28 °C, until the mycelium appeared.
144 DNA from the mycelium was obtained according to the technique described by Hoffman
145 and Winston (Hoffman and Winston, 1987). The DNA concentration was estimated using a
146 NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA), and stored at 4°C until it
147 was required.

148 The internal transcription sequences (ITS) from ribosome genes were amplified by
149 PCR using a thermocycler Bio-Rad T 100 JB Lab, with the universal primers ITS1 (5` TCC
150 GTA GGT GAA CCT GCG G 3`) and ITS4 (5` TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3`)
151 (White et al., 1990); which amplified a 550 bp fragment, including the partial sequence of
152 the 18S subunit, ITS1, 5.8S subunit, ITS2, and the partial sequence of the 28S subunit from
153 ribosomal DNA.

154 The mixtures for the PCR reactions were prepared in 0.2-mL Eppendorf tubes in a
155 final volume of 12.5 μ l. Each reaction contained 0.25 μ l of each primer (Sigma-Aldrich®),
156 0.625 μ l of MgCl₂, 0.2 μ l of dNTPs (Invitrogen™), 0.15 μ l of Taq polymerase
157 (Amplificasa®, BioTecnol, México), 1.25 μ l of 10X PCR reaction buffer, 1 μ l of DNA
158 and 8.77 μ l of sterile-distilled water. Thermal cycling was performed according to the
159 following scheme: one initial denaturalization cycle of 94°C for 5 min, then 38 cycles
160 (denaturalization: 94°C for 30 seconds; annealing: 56°C for 30 seconds; extension: 72°C
161 for one min), and one final extension cycle at 72°C for 5 min. PCR products were
162 visualized on 1% agarose gels in 1X TAE. A GelPilot® 100 bp size marker was used; gels
163 were stained with ethidium bromide (0.1 μ g mL⁻¹) and visualized under UV light using a
164 photo-documenter machine. All PCR products were purified using a QIAquick PCR
165 Purification Kit (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany) following the manufacturer's
166 instructions. The 5.8s DNA region amplified was sequenced by Sanger's method and capillary
167 technology with systems ABI3730 X1 at the Laboratorio Nacional de Genómica para la
168 Biodiversidad (LANGEBIO), CINVESTAV, Irapuato, Guanajuato Mexico). Sequences
169 obtained from fungi strains were alignment using Blast program of GenBank with the goal of
170 determine homology percentages with species previously reported.

171

172 **Growth of *Beauveria bassiana* strains for the *in vitro* bioassays**

173 The isolated *B. bassiana* strains were grown on 1% of a PDA yeast extract in test-tubes
174 which had 500 ppm of chloramphenicol (Sneh, 1991). Cultures were incubated at 25 \pm 1 °C
175 and 80% of RH for 3 weeks. Conidia were harvested by scraping and suspended in sterile
176 distilled water containing 0.1% (v / v) of Tween 80. Then, the suspension was poured into a
177 sterile glass test-tube and homogenized using a vortex mixer. Conidial concentrations were
178 determined by direct counts using an improved Neubauer haemocytometer and adjusted to
179 1 x 10⁸ conidia/ml by dilution, with 0.1% (v / v) of Tween 80 in distilled water. Conidia
180 viability was determined by placing 100 μ l of the conidial suspensions on PDA and
181 counting colonies after 24 - 48 h of incubation (Alves, 1998). For each strain, conidia
182 viability needed to have at least 98% in order to be considered.

183

184 **Collecting the ticks**

185 Four free-tick male calves (3/4 Holstein x 1/4 Zebu) were maintained in individual pens for
186 artificial infestation. Two calves were infested with 5000 larvae of *R. microplus* susceptible
187 to acaricides (Media Joya strain), whereas the other two were infested with the same
188 number of larvae of *R. microplus*, but resistant to acaricides (CLAR strain). Tick
189 infestations were performed every 15 days (three times). The susceptible tick strain was
190 obtained from the Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal
191 (CENAPA), which is recommended by the FAO as a reference strain for Latin America. On
192 the other hand, the acaricide resistant tick strain was obtained from a cattle farm in the
193 municipality of Martinez de la Torre, Veracruz, Mexico. The CLAR strain was determined
194 to be multiresistant to commercial acaricides (organophosphates, pyrethroids and amidines)
195 and endectocides (ivermectin) (Fernández-Salas et al., 2012a, b). Engorged female ticks
196 were collected after 19 to 21 days of post-infestation, directly from the holding pen floors
197 and transported immediately to the laboratory. Upon arrival, ticks were disinfected with 1%
198 of sodium hypochlorite and washed three times with distilled water; then, they were dried
199 with sterile adsorbent paper and used immediately in the adult bioassays.

200 The management and care of the calves was approved by the Subcomité
201 Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (SICUAE), a FMVZ-
202 UNAM program, DC-2013-14 protocol number.

203

204 **Acaricidal evaluation of *Beauveria bassiana***

205 The acaricidal effect of *B. bassiana* strains on engorged female ticks was evaluated using
206 the adult immersion test (Drummond et al., 1967). Conidia suspensions for each *B.*
207 *bassiana* strain were prepared (1×10^8 conidia/ml), and ten engorged female ticks ranging
208 from 0.2 to 0.3 g were treated with the conidia. The control group (ten ticks) was exposed
209 only to distilled water and Tween 80. Three repetitions for each treatment were performed.
210 Treated groups were immersed in the conidial concentration or control group for one
211 minute, and then dried by placing them on paper towels. Ticks from each group were
212 adhered to masking tape strips in Petri dishes, incubated at 27 ± 1.5 °C and 70 – 80% of
213 RH, in order to allow tick oviposition and to allow the fungi to produce its acaricidal effect.
214 Ticks were individually examined under a stereoscopic microscope for detecting fungal
215 infections and mortality was recorded every 2 post-treatment days (PT), during a total

216 period of 20 days. Ticks were considered dead if there was an absence of movement after
217 stimulation, a movement cessation of the malpighian tube, and by the observation of
218 mycelia emerging from the cuticle. Mortality was calculated using the corrected formula
219 (Abott, 1925) recommended by the Food and Agriculture Organization.

220 The effect on the reproductive efficiency index (REI) was evaluated ten days PT.
221 The egg mass from each tick was collected and weighed using an analytical scale. After
222 weighing, eggs were deposited into glass vials (10 ml) with cotton plugs and incubated in
223 order to allow egg hatching, and also for evaluating the possible residual effects of EF
224 during egg hatching. After 21 days, the hatching rates for the different treatments were
225 estimated by counting eggshells. Each bioassay was repeated once on a different day, and
226 the reported results corresponded to the averages of both repetitions.

227

228 **Treatment of *Rhipicephalus microplus* with the selected *Beauveria bassiana* strains**

229 Based on the mortality and REI of *R. microplus*, two *B. bassiana* strains (BbV03 and
230 BbV04) were selected to assess the LC₅₀ and LC₉₉. Another series of adult immersion tests
231 with engorged females, using the CLAR strain (the Media Joya strain was no longer used
232 because there was no difference in mortality among tick populations) was performed at
233 concentrations of 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 and 1×10^5 conidia/ml. Bioassays were
234 performed under the same aforementioned conditions. A mortality analysis between the
235 four concentrations was performed on day 20. The mortality of the control group was lower
236 than 10%.

237

238 **Statistical analysis**

239 Treatment effects on adult mortality and egg hatching inhibition were analyzed using a
240 Kruskal – Wallis test. The reproductive efficiency index (REI = egg mass weight / initial
241 weight of the engorged female) was determined for each engorged female tick. A single
242 ANOVA factor was used to determine the statistical differences of susceptibility among
243 tick populations and REI. Calculation of LC₅₀ and LC₉₉ was performed using a probit
244 analysis. A *P* value of < 0.05 was considered significant.

245 The sequences obtained from fungi DNA were edited and assembled using the
246 BioEdit program (Hall, 1999). Multiple sequence alignments were made using the Clustal

247 W program (Thompson et al., 1994). Maximum parsimony (MP) analyses and the
248 phylogenetic tree of the strains were performed with the Molecular Evolutionary Genetic
249 Analysis (MEGA) software 5.0 (Tamura et al., 2013), using the close-neighbor-interchange
250 algorithm. Branch robustness was estimated by bootstrap analysis with 1000 sampling
251 repetitions of the data. Sequences were aligned using the GenBank Blast program in order
252 to determine homology percentages with previously reported species, and to confirm their
253 identity.

254

255 **Results**

256 The entomopathogenic fungi isolated were identified as *Beauveria bassiana* and we found
257 that our six *B. bassiana* strains were clustered into the same clade with other previously
258 reported *B. bassiana* strains; however, they were separated into three different sub-clades in
259 the phylogenetic tree (two isolates each) (Figure 1).

260 The mortality percentages for the six *B. bassiana* isolates on resistant or susceptible
261 strains of *R. microplus* engorged females are presented in Table I. BbV03 and BbV04
262 showed the highest acaricidal effect against *R. microplus*.

263 In reproductive parameters; the BbV03 strain reduced the egg-laying significantly
264 followed by BbV04 against resistant and susceptible ticks (Table II). None of the fungal
265 strains had any significant residual effects on the egg hatching inhibition of *R. microplus*
266 ($P>0.05$).

267 There were no differences of the effect of *B. bassiana* strains between the *R.*
268 *microplus* populations tested ($P>0.05$; Table III).

269 The BbV03 strain showed the strongest dose-effect relationship against *R.*
270 *microplus* (Table IV).

271

272 **Discussion**

273 In this study, six different strains of *Beauveria bassiana* were isolated from soils
274 (BbV01, BbV02, BbV03, BbV04, BbV05 and BbV06) in cattle farms. Until now, there are
275 few reports concerning EF isolations from paddocks (Yip et al., 1992). In most studies, EF
276 have been isolated from tick or insect corpses that were found inside the paddocks (da
277 Costa et al., 2001). The isolation of EF from cattle farm soils allows knowing the

278 composition of the fungal community in this ecosystem. In this way, the successfully use of
279 the EF as biocontrol agents in tropical environments, needs a better understanding of the
280 ecology and composition of the indigenous populations (Pérez-Gonzales et al., 2014). Thus,
281 the presence of EF in paddocks might highlight their ecological importance, due to their
282 capability of colonizing and controlling the different stages of ticks, such as: eggs, larvae,
283 nymphs and adults (Fernandes and Bittencourt, 2008). The EF might keep the plagues
284 under relative control; otherwise, without this natural control system, the plagues might
285 cause serious damages to plants, crops and domestic or wild animals (Di Barbaro et al.,
286 2009). Therefore, our results contribute to the knowledge regarding the presence of EF in
287 cattle farm soils, which could trigger the beginning of several conservation measures of EF
288 in these important ecosystems, and also could start the creation of new strategy designs for
289 highly effective EF isolations in order to combat ticks.

290 In this study, the isolated EF were identified as *Beauveria bassiana*. Our findings
291 agree with previous studies, where *B. bassiana* was reported to be one of the principal EF
292 isolated from soils (Asencio et al., 2003) and that this species has been reported as one of
293 the most important biological controls for ticks (Jonsson, 2004). The precise identification
294 of these microorganisms is needed in order to differentiate among species, due to the
295 similarity that exists between pathogen and non-pathogen microorganisms for mammals.
296 Also, it is important for establishing the reproductive characteristics or temperature and
297 humidity requirements, and for predicting virulence profiles against plagues (Bishoff et al.,
298 2009; Rehner et al., 2011). Indeed, an important path of knowledge corresponds to the
299 genetic interrelationships between fungal species. Meyling et al. (2009) demonstrated that a
300 particular habitat might host different species and distinct genetic groups within the same
301 species, as well. The boundaries between species in the EF genera are based only in
302 morphological studies; nevertheless, genetic analyses are necessary in order to establish
303 clear relationships between species. The analysis of the phylogenetic relationships revealed
304 any genetic distance between the members of the *B. bassiana* isolates and also, the presence
305 of three probable phylogenetic lineages (Figure 1). This finding suggests that in cattle farm
306 soils, there is probably a genetic complexity in the species of *B. bassiana* fungi. Neelapu et
307 al. (Neelapu et al., 2009) demonstrate that the *B. bassiana* complex varies narrowly in the
308 different lineages and shows a clear phylogenetic separation. Probably, we found three

309 different sub-species of *B. bassiana*, but unfortunately the differentiation at sub-species
310 level was not possible to obtain in this study, due to the molecular technique used.

311 In terms of mortality, similar results (82.29 % to 86.54 %) were reported for *R.*
312 *microplus* engorged females using four *B. bassiana* isolates, nonetheless the authors
313 applied a higher dose of conidia (1×10^9 conidia/ml) (Campos et al., 2010). Paião et al.
314 (2001) reported a mortality mean of 88.7%, when using five *B. bassiana* strains at 1×10^8
315 conidia/ml and Sun et al. (2013) obtained a 100% of mortality against *R. microplus* after
316 treatment with *B. bassiana* (B.bAT17 strain) on the 10th day. Nevertheless, other results
317 reported non-significant mortality effects when using a *B. bassiana* (Bb986) strain on *R.*
318 *microplus* (Camargo et al., 2012). Differences among studies could be attributed to the
319 virulence and pathogenicity of each *B. bassiana* strain, isolated from different
320 environments and hosts; fungal virulence varies depending on its ability to penetrate the
321 insect cuticle, which is related with the toxin and/or enzyme production and with the
322 *appresoria* formation. Also, this variation could be due to the interaction of several factors
323 inherent to ticks, such as their immunological defense (Anderson et al., 2011). Moreover,
324 fungi might lose their virulence or pathogenicity because of the constant propagation or
325 management on artificial media. It has been reported that *B. bassiana* has different
326 metabolic responses depending, whether it is grown on pupal extracts or root exudates (Luo
327 et al., 2005). Indeed, it has been hypothesized that an isolate may focus its energy into the
328 vegetative growth, instead of producing a large amount of toxins in some situations of
329 nutrient's availability (Kershaw et al., 1994). The fungi evaluated in the present study were
330 recently isolated from cattle farms, so their reproduction on artificial media was low.
331 Indeed, these fungi are native to pastures where they co-habit with *R. microplus* ticks,
332 giving them -probably- a better capacity to colonize and kill ticks. Although the evaluated
333 strains did not reach a 100% of mortality, our results are encouraging because *B. bassiana*
334 strains are generally less pathogenic against ticks than other EF (Gindin et al., 2002).
335 Moreover, we observed that a nearly 90% of the infected ticks were covered with mycelia
336 and allowed the *B. bassiana* sporulation (data not shown). At the field level, tick bodies
337 showing sporulation may serve as reservoirs or vectors of fungal conidia, permitting the
338 fungi to be transmitted from an infected tick to susceptible ones, under different stages of
339 development.

340 The effect of *B. bassiana* strains on the engorged female reproduction (egg laying
341 and egg hatching) could help to decrease tick populations in pastures. Perinotto et al. (2012)
342 and Sun et al. (2013) reported similar fungal effects using *B. bassiana* strains on the egg
343 laying of *R. microplus*. Other studies have shown a higher egg laying reduction (Campos et
344 al., 2010; Sun et al., 2013). However, Camargo et al. (2012) and Paião et al. (2001) did not
345 find any inhibitory effects on the *R. microplus* oviposition using some *B. bassiana* isolates.
346 The variation of *B. bassiana* effects on the reproductive parameters of *R. microplus* is
347 highly related to their capacity of killing the ticks quickly. Each fungal strain has a different
348 timing for tick termination, where the growth kinetics and toxin production are two of the
349 main factors influencing this difference (Clarkson and Charnley, 1996). The virulence of a
350 fungal strain may reduce the *R. microplus* growth rates in grasslands that are used for cattle
351 grazing. An engorged female of *R. microplus*, can oviposit between 2500 – 3500 eggs
352 (Davey et al., 2006) thus, an inhibition of 25% to 35% (obtained with BbV04 and BbV03),
353 will reduced about 750 – 1050 eggs per tick, implicating a larval diminish in grasslands.
354 Also, the residual effects from EF can still working against egg hatching in order to reduce
355 tick populations in the field, nevertheless in this study, none of the fungal strains had any
356 significant residual effects on the egg hatching inhibition of *R. microplus*. Most likely, the
357 inhibitory effect of EF against hatchability is more effective under field conditions, since
358 the eggs are not removed from the infected engorged females (contrary to bioassays),
359 allowing the conidia to be transmitted directly to them.

360 On the other hand, the acaricidal effect of *B. bassiana* isolates, between two
361 populations of *R. microplus* (resistant or susceptible to chemical acaricides), was compared.
362 Some reports similar to this study did not found any mortality differences between
363 susceptible and resistant tick populations that were treated with *M. anisopliae* or with *B.*
364 *bassiana* strains (Fernández-Ruvalcaba et al., 2005). Other studies did not reported any
365 mortalities in a resistant population of *R. microplus* (Bahense et al., 2008). Our results
366 suggest that the resistance mechanism used by ticks in order to avoid the toxic effects of
367 chemical acaricides did not affect the infective mechanisms of the *B. bassiana* tested
368 strains. The form in which the EF kill the ticks is really diverse (Tellez-Jurado et al., 2009),
369 suggesting that the resistance to biological control agents is less likely to occur, than in
370 those observed for chemical acaricides. This lower probability for developing resistance

371 and the virulence knowledge of the EF will help to justify and design new control strategies
372 for resistant ticks under field conditions, using fungi as the main control agents.

373 Regarding virulence, we determined the LC₅₀ and LC₉₉ of the BbV03 and BbV04
374 strains, since both showed higher acaricidal effects in terms of mortality and egg laying
375 inhibition on *R. microplus* engorged females. In previous studies, where the EF were used
376 against *R. microplus*, the LC₅₀ values had been calculated (Campos et al., 2010; Sun et al.,
377 2013); however, until now, there are no studies concerning LC₉₉. The determination of
378 LC₅₀ as a unique parameter of infectivity could result in a high variability of the acaricidal
379 effect (Fernández-Ruvalcaba et al., 2005), while the analysis of an LC₉₉ estimate could be
380 an important indicator of the real virulence of the EF strains. Thus, our LC₅₀ and LC₉₉ data
381 showed dose-dependent acaricidal effects of BbV03 and BbV04 within acceptable
382 virulence degrees. Also, these results allow determining the correct dosages for the BbV03
383 and BbV04 strains during field acaricidal evaluations, using natural infestations.
384 Nevertheless, more research is still required in order to develop effective formulations for
385 tick control on the field.

386 In conclusion, these results showed that *B. bassiana* is present in the pastures of tropic
387 cattle farms and that probably there are genetic variations between members of the
388 *bassiana* species, amplifying the opportunities to find an organism highly pathogen to ticks.
389 BbV03 and BbV04 strains have acaricidal effects against *R. microplus* resistant or
390 susceptible to chemicals, so they may be considered as promising co-adjuvants for
391 controlling *R. microplus* field populations without consider its toxicological behavior.

392

393 **ACKNOWLEDGMENTS**

394 We are very grateful to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Mexico (CONACyT)
395 for supporting Agustín Fernández-Salas during his PhD program at FMVZ-UNAM.

396

397 **LITERATURE CITED**

398 Fernández-Salas, A., M. A. Alonso-Díaz, R. Acosta-Rodríguez, J. F. Torres-Acosta, C.
399 Sandoval-Castro, and R. I. Rodríguez-Vivas. 2011. *In vitro* acaricidal effect of tannin-rich
400 plants against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae).
401 *Veterinary Parasitology* **175**: 113-118.

402

403 Samish, M., H. Ginsberg, and I. Glazer. 2004. Biological control of ticks. *Parasitology* **129**:
404 389-403.

405

406 Paião, J. C. V., A. C. Monteiro, and S. N. Kronka. 2001. Susceptibility of the cattle tick
407 *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. *World*
408 *Journal of Microbiology and Biotechnology* **17**: 245-251.

409

410 Perinotto, W. M. S., I. C. Angelo, P. S. Golo, S. Quinelato, M. G. Camargo, F. A. Sá, and
411 V. R. E. P. Bittencourt. 2012. Susceptibility of different populations of ticks to
412 entomopathogenic fungi. *Experimental Parasitology* **130**: 267-270.

413

414 Sun, M., Q. Ren, G. Guan, Y. Li, X. Han, C. Ma, H. Yin, and J. Luo. 2013. Effectiveness of
415 *Beauveria bassiana* [*sensu lato*] strains for biological control against *Rhipicephalus*
416 (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) in China. *Parasitology International* **62**: 412-415.

417

418 Leemon, D. M., L. B. Turner, and N. N. Jonsson. 2008. Pen studies on the control of cattle
419 tick (*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin).
420 *Veterinary Parasitology* **156**: 248-260.

421

422 Rangel, D. E. N., G. U. L. Braga, A. J. Anderson, and D. W. Roberts. 2005. Variability in
423 conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic
424 origins. *Journal of Invertebrate Pathology* **88**: 116-125.

425

426 Fernandes, É. K. K., and V. R. E. P. Bittencourt. 2008. Entomopathogenic fungi against
427 South American tick species. *Experimental and Applied Acarology* **46**: 71-93.

428

429 Feng, M. G., T. J. Poprawski, and G. G. Khachatourians. 1994. Production, formulation and
430 application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current
431 status. *Biocontrol Science and Technology* **4**: 3-34.

432

433 Pérez-González, V. H., A. W. Guzmán-Franco, R. Alatorre-Rosas, J. Hernández-López, A.
434 Hernández-López, M. G. Carrillo-Benítez, and J. Baverstock. 2014. Specific diversity of
435 the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils.
436 *Journal of Invertebrate Pathology* **119**: 54–61.
437

438 Meyling, N.V., M. Lübeck, E. P. Buckley, J. Eilenberg, and S. A. Rehner. 2009.
439 Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen
440 *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Molecular Ecology* **18**:
441 1282-1293.
442

443 INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). 2000. Técnicas de toma y remisión
444 de muestras de suelos. Ediciones: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
445 [http://inta.gob.ar/sites/default/files/script_tmp_tecnicas_de_toma_y_remisin_de_muestras_](http://inta.gob.ar/sites/default/files/script_tmp_tecnicas_de_toma_y_remisin_de_muestras_de_suelos.pdf)
446 [de_suelos.pdf](http://inta.gob.ar/sites/default/files/script_tmp_tecnicas_de_toma_y_remisin_de_muestras_de_suelos.pdf). Accessed 12 Jan 2017.
447

448 Rendón, S.G. 1994. Muestreo: Aplicación en la estimación simultanea de varios
449 parámetros. Departamento de Parasitología Agrícola. Colegio de Postgraduados. Chapingo,
450 México, 246 p.
451

452 Dalgliesh, N. P., and M. A. Foale. 1998. Soil matters-Monitoring soil water and nutrients in
453 dryland farming systems (CSIRO/Agricultural Production Systems Research Unit:
454 Technical Manual ISBN 0 643 06375 7).
455 [https://www.researchgate.net/publication/270893475_Soil_matters_Monitoring_soil_water](https://www.researchgate.net/publication/270893475_Soil_matters_Monitoring_soil_water_and_nutrients_in_dry_land_farming)
456 [_and_nutrients_in_dry_land_farming](https://www.researchgate.net/publication/270893475_Soil_matters_Monitoring_soil_water_and_nutrients_in_dry_land_farming). Accessed 23 Jan 2017.
457

458 Pleysier, J.L. 1995. Soil sampling and sample preparation. Vol 2. International Institute of
459 Tropical Agriculture, p. 27.
460

461 Zimmermann, G. 1986. The *Galleria* bait method for detection of entomopathogenic fungi
462 in soil. *Journal of Applied Entomology* **102**: 213–215.

463 Humbert, R. 1996. Fungi Identification. Manual of techniques in insect pathology. USDA-
464 ARS Plant Protection Research. Ithaca NY. Chapter V-1. p. 153–185.
465

466 Hoffman, C.S., and F. Winston. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast
467 efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**:
468 267-272.
469

470 White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of
471 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* PCR Protocols: a guide to methods and
472 applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (eds.). Academic
473 Press. p. 315-322.
474

475 Sneh, B. 1991. Isolation of *Metarhizium anisopliae* from insects on an improved selective
476 medium based on wheat germ. *Journal of Invertebrate Pathology* **58**: 269-273.
477

478 Alves, S. B. 1998. Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba: FEALQ. 1163 p.
479

480 Fernández-Salas, A., M. A. Alonso-Díaz, R. I. Rodríguez-Vivas, and H. Basurto-Camberos.
481 2012a. Ivermectin resistance status and factors associated in *Rhipicephalus microplus*
482 (Acari: Ixodidae) populations from Veracruz, Mexico. *Veterinary Parasitology* **190**: 210-
483 215.
484

485 Fernández-Salas, A., R. I. Rodríguez-Vivas, and M. A. Alonso-Díaz. 2012b. First report of
486 a *Rhipicephalus microplus* tick population multiresistant to acaricides and macrocyclic
487 lactones in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology* **183**: 338-342.
488

489 Drummond, R.O., O. H. Graham, S. E. Ernst, and J. L. Trevino. 1967. Evaluation of
490 insecticides for the control of *Boophilus annulatus* (Say) and *B. microplus* (Canestrini)
491 (Acarina: Ixodidae) on cattle. Proceedings, 2nd International Congress of Acarology.
492 Bonington, England, p. 493-498.
493

494 Abott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of
495 Economic Entomology **18**: 265-267.
496

497 Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis
498 program for Windows 95/98/NT. In Nucleic acids symposium series [London]: Information
499 Retrieval Ltd **41**: 95-98.
500

501 Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the
502 sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,
503 position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research **22**: 4673-
504 4680.
505

506 Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: molecular
507 evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution **30**: 2725-
508 2729.
509

510 Yip, H.Y., A. C. Rath and T. B. Koen. 1992. Characterization of *Metarhizium anisopliae*
511 isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer
512 (Coleoptera: Scarabaeidae: *Adoryphorus couloni*). Mycological Research **96**: 92-96.
513

514 da Costa, G. L., M. I. M. Sarquis, A. M. L. de Moraes, and V. R. E. P. Bittencourt. 2001.
515 Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from
516 *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil.
517 Mycopathologia **154**: 207-209.
518

519 Di Barbaro, G., S. Pernasetti, and M. Jorratti. 2009. ¿Qué son y qué roll juegan los
520 microorganismos en el ambiente y en la fertilidad de los suelos? Revista de Divulgación
521 Técnica, Agrícola y Agroindustrial. **3**: 1-7.
522

523 Asencio, L., T. Carbonell, J. A. López-Jiménez, and L. V. Lopez-Llorca. 2003.
524 Entomopathogenic fungi in soils from Alicante province. Spanish Journal of Agricultural
525 Research. **1**: 37-45.
526

527 Jonsson, N. N. 2004. Integrated control programme for ticks: an examination of some
528 possible components. FAO Animal Production and Health Paper. Approaches to the control
529 of ticks, p. 78.
530

531 Bischoff, J.F., S. A. Rehner, and R. A. Humber. 2009. A multilocus phylogeny of the
532 *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycologia **101**: 512–530.
533

534 Rehner, S.A., A. M. Minnis, G. H. Sung, J. J. Luangsa-ard, L. Devetto, R. A. Humber.
535 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*.
536 Mycologia **103**: 1055–1073.
537

538 Neelapu, N.R., A. Reineke, U. M. Chanchala, and U.D. Koduru. 2009. Molecular
539 phylogeny of asexual entomopathogenic fungi with special reference to *Beauveria bassiana*
540 and *Nomuraea rileyi*. Revista Iberoamericana de Micología **26**: 129-145.
541

542 Campos, R. A., J. T. Boldo, I. C. Pimentel, V. Dalfovo, W. L. Araújo, J. L. Azevedo, M. H.
543 Vainstein, and N. M. Barros. 2010. Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria*
544 spp. to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Genetics and
545 Molecular Research **9**: 1421-1430.
546

547 Camargo, M. G., P. S. Golo, I. C. Angelo, W. M. S. Perinotto, F. A. Sá, S. Quinelato, and
548 V. R. E. P. Bittencourt. 2012. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to
549 control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. Veterinary Parasitology
550 **188**: 140-147.
551

552 Anderson, R.D., A. S. Bell, S. Blanford, K. P. Paaijmans, and M. B. Thomas. 2011.
553 Comparative growth kinetics and virulence of four different isolates of entomopathogenic

554 fungi in the house fly (*Musca domestica* L.). Journal of Invertebrate Pathology **107**: 179-
555 184.

556

557 Luo, F., Q. Wang, C. Yin, Y. Ge, F. Hu, H. Bo, H. Zhuo, G. Bao, B. Wang, R. Lu, and Z.
558 Li. 2015. Differential metabolic responses of *Beauveria bassiana* cultured in pupae
559 extracts, root exudates and its interactions with insect and plant. Journal of Invertebrate
560 Pathology **130**: 154-164.

561

562 Kershaw, M. J., E. R. Moorhouse, R. Bateman, S. E. Reynolds, and A. K. Charnley. 1994.
563 The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of
564 insects. Journal of Invertebrate Pathology **74**: 213-223.

565

566 Gindin, G., M. Samish, G. Zangi, A. Mishoutchenko, and I. Glazer. The susceptibility of
567 different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. Experimental and Applied
568 Acarology **28**: 283-288.

569

570 Clarkson, J. M., and A. K. Charnley. 1996. New insights into the mechanisms of fungal
571 pathogenesis in insects. Trends in Microbiology **4**: 197-203.

572

573 Davey, R. B., J. E. George, and R. J. Miller. 2006. Comparison of the reproductive biology
574 between acaricides-resistant and acaricide-susceptible *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
575 (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology **139**: 211-220.

576

577 Fernández-Ruvalcaba, M., E. Zhioua, and V. García-Vázquez. 2005. Infectividad de
578 *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Boophilus microplus* sensible y
579 resistente a los organofosforados. Técnica Pecuaria México **43**: 433-440.

580

581 Bahiense, T.C., E. K. K. Fernandes, J. C. Angelo, W. M. S. Perinotto, and V. R. E. P.
582 Bittencourt. Performance of *Metarhizium anisopliae* and its combination with Deltamethrin
583 against a pyrethroid-resistant strain of *Boophilus microplus* in a stall test. Annals of the
584 New York Academic of Science **1149**: 242-245.

585 Téllez-Jurado, A., M. G. Cruz-Ramírez, Y. Mercado-Flores, A. Asaff-Torres, A. Arana-
586 Cuenca. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos
587 entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología* **30**: 73-80.

588

589 Figure 1. Phylogenetic relationship of *Beauveria bassiana* from cattle farm soils with other
590 isolates from Mexico and other countries.

591

592 **Footnote**

593 **Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical, Facultad de*
594 *Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Martínez*
595 *de la Torre, Veracruz, México.*

596

597 †*Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y*
598 *Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.*

599

600 ‡*Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima. Tecomán,*
601 *Colima, México.*

602

603 §*Unidad de Microbiología Básica y Aplicada, Campus Aeropuerto, Universidad Autónoma*
604 *de Querétaro, Qro. México.*