

# Compatibilidad *in vitro* de *Metarhizium anisopliae* con ixodicidas químicos para el control de *Rhipicephalus microplus*

Ana L. Valverde-Sánchez<sup>1</sup>, Xiomara Mata-Granados<sup>1</sup>, Roberto Lezama-Gutiérrez<sup>2</sup>, Marlen Camacho-Calvo<sup>1</sup>  
Escuela de Agronomía<sup>1</sup>, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias<sup>2</sup>,  
Instituto Tecnológico de Costa Rica<sup>1</sup>, Universidad de Colima<sup>2</sup>  
Florencia, Ala., Costa Rica<sup>1</sup>; Tecomán, Col., México<sup>2</sup>  
analissette@live.com, [xmata, mcamacho]@itcr.ac.cr, rlezama@ucol.mx

**Abstract**— The objective of this study was evaluated the compatibility *in vitro* of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) with five active ingredients of acaricides, used in the control of *R. microplus*, and it was determined the percentage of colonization, germination of conidia (CFU/mL) and sporulation of the fungus (conidia/mL) it was determined by the technique using discs impregnated with conidia mixture and acaricides. The active ingredients evaluated were Cypermethrin, Flumethrin, Coumaphos, Cyamizol + Cyfluthrin and Amitraz, 100, 50 y 33 % on the label recommended of each product concentrations. It was determined that Cypermethrin, Flumethrin and Coumaphos, of the evaluated acaricides not affect physiological and reproductive parameters of *M. anisopliae* (LaBioMt<sub>sl.o.tal</sub>).

**Keyword**— entomopathogenic fungi, biological control, tick.

**Resumen**— El objetivo de este estudio fue evaluar la compatibilidad *in vitro* de *Metarhizium anisopliae* con cinco ingredientes activos de ixodicidas, utilizados en el control de *R. microplus*, se determinó el porcentaje de colonización, germinación de conidios (UFC/mL) y esporulación del hongo (conidios/mL), mediante la técnica de discos impregnados y mezcla de conidios con los acaricidas. Los ingredientes activos evaluados fueron Cipermetrina, Flumetrina, Coumaphos, Cyamizol + Cyflutrín y Amitraz, al 100, 50 y 33 % de las concentraciones recomendadas en la etiqueta de cada producto. Se determinó que Cipermetrina, Flumetrina y Coumaphos, no afectan los parámetros fisiológicos y reproductivos de *M. anisopliae* (LaBioMt<sub>sl.o.tal</sub>).

**Palabras claves**— hongos entomopatógenos, control biológico, garrapata.

## I. INTRODUCCIÓN

En Costa Rica la ganadería bovina es una actividad que representa el 75 % del Producto Interno Bruto Pecuario (PIB Pecuario) y el 16 % del Producto Interno Bruto Agropecuario (PIB Agropecuario), esta actividad abarca el 26 % del territorio nacional, lo cual muestra la importancia de este sector para el país, además de ser fuente importante de divisas (Pérez et al., 2006). Sin embargo, en las regiones tropicales y subtropicales la garrapata *Rhipicephalus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) constituye uno de los principales problemas en la ganadería bovina (Muro et al., 2003; Estrada-Peña et al., 2006a,b), Ojeda-Chi et al. (2011) mencionan que éstas pueden causar grandes daños en la producción de carne, leche y cuero. Por su parte, Ojeda-Chi et al. (2011), Manjunathachar et al. (2014) y Antunes et al. (2015) reportan que estos ácaros transmiten agentes patógenos a los bovinos que propician el desarrollo de enfermedades, lo que directamente ocasiona pérdidas económicas de hasta US\$ 2.5 billones al año alrededor del mundo (Lew-Tabor et al., 2014).

Wall y Shearer (2001) y Sonenshine y Roe (2013) indican que en climas tropicales el ciclo de vida de *R. microplus* es de alrededor de dos meses, no obstante Wall y Shearer (2001) demuestran que este período se puede extender por más tiempo si las condiciones son desfavorables. Cortés (2010) menciona que las garrapatas son sensibles a los cambios ambientales; por consiguiente, el cambio

climático puede afectar la frecuencia y distribución de éste ectoparásito a nivel mundial, lo que repercute negativamente en la actividad ganadera. De acuerdo con los estudios realizados por Cortés et al. (2010) este ectoparásito se ha trasladado a nuevas zonas geográficas en pocos años.

Esta situación pone en alerta a este sector y obliga a generar investigación, no sólo en estudios de comportamiento sino también en la búsqueda de alternativas para su control, ya que en la actualidad su principal método de control se basa en el uso de ixodicidas químicos (Polar et al., 2005a,b; Abbas et al., 2014). Rodríguez-Vivas et al. (2006a), Mendes et al. (2007), Rodríguez-Vivas et al. (2007), Fernandes y Bittencourt (2008), Ojeda-Chi et al. (2010) y Castro-Janer et al. (2011), indican que el uso irracional de ixodicidas ha provocado que poblaciones de *R. microplus* hayan adquirido resistencia hacia los piretroides compuestos organofosforados, y Rodríguez-Vivas et al. (2006b), Bravo et al. (2008), Rosado-Aguilar et al. (2008) y Jonsson et al. (2010) mencionan la resistencia hacia las amidinas. Por su parte, Anderson (2002) y Anderson y Magnarelli (2008) reportan los efectos de estos acaricidas sobre la salud humana, mientras que Rajput et al. (2006), Parizi et al. (2009) y Fernandes et al. (2012) informan los efectos sobre el ambiente. Por lo anterior, se buscan alternativas no químicas para el control de garrapatas (Alonso-Díaz et al., 2006; Alonso-Díaz et al., 2007).

Dentro de las alternativas que tienden hacia la sostenibilidad del sistema se encuentra el control biológico, que de acuerdo con Ostfeld et al. (2006) representa un método con potencial contra las garrapatas. El uso de hongos entomopatógenos ha mostrado buena efectividad para el control de garrapatas, entre ellas *R. microplus* (Fernandes y Bittencourt, 2008; Fernandes et al., 2011), en particular con el uso del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) (Ojeda-Chi et al., 2010; Ojeda-Chi et al., 2011; Rodríguez-Alcocer et al., 2014).

Fernández-Ruvalcaba et al. (2005) reportan que *M. anisopliae* ejerce un efecto controlador sobre *R. microplus*, resistentes y susceptibles a productos químicos organofosforados; por otra parte, Frazzon et al. (2000) en estudios *in vitro*, determinaron que diferentes aislados de *M. anisopliae* ocasionan una mortalidad de hasta 100 % sobre hembras ingurgitadas de esta garrapata. Otro estudio realizado por Fernández et al. (2010) demuestra que cepas de *M. anisopliae* reducen el potencial de diferentes parámetros reproductivos, por lo que se establece la necesidad de continuar con estudios experimentales, con los cuales se pueda contar con un método de control efectivo, y más importante aún, permitan establecer un manejo integrado con miras hacia una sostenibilidad efectiva del sistema.

Varios estudios han analizado el efecto de plaguicidas sobre hongos entomopatógenos para determinar su compatibilidad en el control de plagas (Neves et al., 2001; Loureiro et al., 2002; Kassab et al., 2014); la mayoría de esos reportes fueron llevados a cabo mediante la adición de los productos al medio de cultivo usado para el crecimiento de los hongos, con el fin de conocer sus efectos sobre la germinación y desarrollo de la colonia; otros trabajos han utilizado mezclas de hongos y dosis reducidas de insecticidas, a fin de modificar el estado fisiológico del insecto e incrementar la mortalidad de la plaga (Gruner, 1973).

En este contexto, el objetivo de la presente investigación fue determinar *in vitro* la compatibilidad del aislado LaBioMt<sub>slo.tal</sub> de *M. anisopliae* ante cinco ingredientes activos de uso común, para el control de *R. microplus* sobre la germinación de conidios, porcentaje de colonización y esporulación del hongo.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Ubicación del área de estudio

Las pruebas experimentales *in vitro* se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología y Biocontroladores del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede Regional San Carlos, ubicado en el distrito de Florencia perteneciente al cantón de San Carlos, provincia de Alajuela, Costa Rica, cuyas

coordenadas geográficas son 10° 21' 42" de latitud norte y 84° 30' 36" de longitud oeste, con una elevación media de 170 msnm, precipitación anual media acumulada de 3100 mm, una temperatura anual media de 25.6 °C y 84 % de humedad relativa.

### B. Aislado de *M. anisopliae* y condiciones de cultivo

En este estudio se utilizó el aislado codificado como LaBioMt<sub>slo.tal</sub> de *M. anisopliae*, perteneciente al Laboratorio de Fitopatología y Biocontroladores de la Escuela de Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica, obtenido de suelo de Talamanca, Costa Rica. Dicho hongo fue sembrado en papa dextrosa agar (PDA) (Oxoid) en placas de Petri estériles de 90 x 10 mm (diámetro x alto) e incubado a 27.5 ± 2 °C, 80 % de humedad relativa, oscuridad continua, durante 8 días.

A partir de cultivos monospóricos, se realizó la producción masiva del hongo utilizando como sustrato granos de arroz estériles (Lezama y Munguía, 1990). Para ello, se formó una suspensión de conidios (10<sup>9</sup> conidios/mL) de la que se tomaron 15 mL con una jeringa estéril para inocular 100 g de granos de arroz estériles contenidos en una matriz; luego se agitó manualmente, con el fin de que todos los granos se impregnaran de las esporas del hongo. Finalmente, la matriz se incubó durante 8 días a 27.5 ± 2 °C, 80 % de humedad relativa y oscuridad continua (Obregón, 2000).

### C. Ixodicidas químicos

Se eligieron cinco ixodicidas, que son utilizados comúnmente en Costa Rica para el control de *R. microplus* en ganado bovino. Los acaricidas se evaluaron al 33, 50 y 100 % de la concentración indicada en la etiqueta técnica de cada producto, según se observa en el Tabla 1.

Tabla I. Tratamientos para la prueba de compatibilidad con la técnica de discos impregnados.

Tratamiento	Nombre químico del principio activo	Concentraciones del ingrediente activo (ppm)
T1	Cipermetrina	150.0
T2		75.0
T3		49.5
T4	Flumetrina	30.0
T5		15.0
T6		9.9
T7	Coumaphos	200.0
T8		100.0
T9		66.0
T10	Cyamizol + Cyflutrin	312.5 + 50.0
T11		155.0 + 24.8
T12		105.0 + 16.8
T13	Amitraz	250.0
T14		125.0
T15		83.7
T16	Testigo	No aplica

### D. Compatibilidad de *M. anisopliae* ante cinco ingredientes activos

La evaluación *in vitro* de la compatibilidad de *M. anisopliae* (LaBioMt<sub>slo.tal</sub>) con los ixodicidas seleccionados se realizó mediante dos metodologías: el método de discos impregnados y la mezcla de conidios con los ingredientes activos indicados.

### E. Método de discos impregnados

Para cada ingrediente activo se prepararon 25 mL de cada concentración arriba mencionada y en cada una de ellas se impregnaron 15 discos de papel filtro estéril (grado 5 915-A. Corporación Arlequín S. A. de C. V., México) de 0.5 cm de diámetro, por cada tratamiento. En el tratamiento testigo los discos se impregnaron con agua destilada estéril.

Simultáneamente se realizó la siembra de *M. anisopliae* (LaBioMt<sub>slo.tal</sub>), a partir de una suspensión de conidios, a la concentración de  $10^6$  conidios/mL, en cajas de Petri con (PDA), con 0.3 mL por caja y con una espátula de Drigalsky estéril se efectuó la siembra del hongo. Después de realizada la siembra del hongo, a un grupo de tres cajas se le colocaron cinco discos por caja, impregnados con el ixodicida a la concentración correspondiente. Posteriormente, las cajas se sellaron y etiquetaron según el tratamiento y se incubaron a una temperatura de  $27.5 \pm 2$  °C, humedad relativa de 80 %, durante un período de 12 días.

### F. Tratamientos y variables

El bioensayo constó de 16 tratamientos con 3 repeticiones cada uno, de los cuales el testigo, correspondió al control absoluto (Tabla 1). Para obtener el porcentaje de colonización del hongo (% Col), bajo el efecto de los diferentes ingredientes activos y concentraciones de los ixodicidas; cada 48 horas después de efectuada la siembra del hongo y durante 12 días, se realizaron mediciones del diámetro del halo de inhibición en centímetros, con un vernier digital (Stainless). El porcentaje de colonización (%Col) se determinó con la fórmula (1):

$$\%Col = \left( \frac{AP_T - AH_T}{AP_T} \right) \times 100 \quad (1)$$

En donde:

$AP_T$  = Área de la placa de Petri

$AH_T$  = Área del halo de inhibición

### G. Análisis estadísticos

Para la determinación de la variable de respuesta en el bioensayo se utilizó un diseño completamente al azar, con arreglo factorial  $5 \times 3 + 1$ , que correspondió a cinco ixodicidas, tres concentraciones de cada ixodicida (agua destilada estéril únicamente en el caso del control), más un control absoluto (sin ixodicida). Se incluyó un control absoluto (agua) para contrarrestar el efecto de la adición del agua en cada aplicación. Los datos fueron analizados mediante la técnica de modelos lineales generalizados (GLM) con la prueba de comparación de Bonferroni, para la comparación entre tratamientos; todas las pruebas se realizaron con un nivel de confiabilidad del 95 %, empleando el software estadístico InfoStat versión 2014 (Di Rienzo et al., 2014).

### H. Mezcla de conidios e ingredientes activos

Se preparó una suspensión de conidios de *M. anisopliae* (LaBioMt<sub>slo.tal</sub>) con una concentración de  $10^9$  conidios/mL, de la que se tomó 100 mL y se colocó en un matraz de Erlenmeyer. A cada matraz se le adicionó la cantidad de ingrediente del activo respectivo, a la concentración del producto químico de cada tratamiento (Tabla 1). Posteriormente, los matraces de Erlenmeyer con la mezcla se colocaron en un agitador orbital a 160 rpm durante 24 horas; transcurrido este período con cada uno de ellos se realizó una dilución para obtener las concentraciones de  $10^3$  y  $10^4$  conidios/mL. Se pipetearon 0.3 mL por concentración, los que se vertieron en placas de Petri con PDA y con una espátula de Drigalsky esterilizada se dispersaron los conidios en la superficie del medio. Finalmente, las cajas de Petri se

sellaron con cinta, se etiquetaron según el tratamiento asignado y se incubaron por 12 días a oscuridad continua, a una temperatura y humedad relativa de  $27.5 \pm 2$  °C y 80 %, respectivamente.

*I. Tratamientos y variables*

Este ensayo constó de 32 tratamientos con tres repeticiones, para un total de 96 unidades, en las cuales se incluyeron los respectivos testigos para las dos concentraciones del hongo ( $10^3$  y  $10^4$  conidios/mL) (Tabla 2). Se registró el número de conidios germinados por cada repetición, 48 horas después de la siembra, para determinar el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), utilizando la fórmula (2):

$$\frac{UFC}{mL} = N^{\circ} CP \times 3.33 \times \left(\frac{1}{FD}\right) \tag{2}$$

En donde:

UFC/mL = Unidades formadoras de colonias por mililitro

N° CP = Número de colonias por placa de Petri

FD = Factor de dilución (Inversa de la dilución)

Tabla II. Tratamientos de la prueba mediante la técnica de mezcla de conidios e ingredientes activos.

Tratamiento	Nombre químico	Concentraciones del ingrediente activo (ppm)	Concentración del hongo (conidios/mL)
T1	Cipermetrina	150.0	$10^4$
T2		75.0	
T3		49.5	
T4		150.0	$10^3$
T5		75.0	
T6		49.5	
T7	Flumetrina	30.0	$10^4$
T8		15.0	
T9		9.9	
T10		30.0	$10^3$
T11		15.0	
T12		9.9	
T13	Coumaphos	200.0	$10^4$
T14		100.0	
T15		66.0	
T16		200.0	$10^3$
T17		100.0	
T18		66.0	
T19	Cyamizol + Cyflutrin	312.5 + 50.0	$10^4$
T20		155.0 + 24.8	
T21		105.0 + 16.8	
T22		312.5 + 50.0	$10^3$
T23		155.0 + 24.8	
T24		105.0 + 16.8	
T25	Amitraz	250.0	$10^4$
T26		125.0	
T27		83.7	
T28		250.0	$10^3$
T29		125.0	
T30		83.7	
T31	Testigo	No aplica	$10^4$
T32		No aplica	$10^3$

### J. Análisis estadísticos

Los tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar, con arreglo factorial 5 x 3 x 2 + 2, que correspondió a cinco ixodicidas, tres concentraciones de cada ixodicida y dos concentraciones de *M. anisopliae* (LaBioMt<sub>slo.tal</sub>). Además, se incluyeron dos testigos que no recibieron ixodicida, pero sí las concentraciones de *M. anisopliae*. Los datos fueron analizados mediante la técnica de modelos lineales generalizados (GLM) con la prueba de Bonferroni, para la comparación entre tratamientos; todas las pruebas se realizaron con un nivel de confiabilidad del 95 %, empleando el software estadístico InfoStat versión 2014 (Di Rienzo et al., 2014).

### K. Efecto sobre la esporulación

Para cada uno de los dos ensayos arriba descritos, se procedió a evaluar el efecto de los diferentes ingredientes activos sobre la esporulación del hongo, en tres concentraciones de los ixodicidas, a los 12 días después de efectuada la siembra del hongo. Para cada tratamiento, se procedió a tomar cuatro discos con el hongo crecido, mismos que se colocaron en un tubo de ensayo que contenía 10 mL de agua destilada estéril y 0.1 mL de Tween 80 mediante una aguja esterilizada. La suspensión se agitó manualmente durante un minuto y se contabilizó el número de conidios por mililitro, con ayuda de un hemocitómetro (Boeco®, Neubauer, Germany). En total se efectuaron seis conteos de la suspensión de conidios por cada tratamiento. La concentración de conidios por mililitro (conidios/mL) de cada tratamiento se determinó con la fórmula (3):

$$\text{conidios/mL} = \left( \frac{N^{\circ} C}{25} \right) \times FC \times FD \quad (3)$$

En donde:

conidios/mL = Concentración del número de conidios por mililitro

N° C = Número de conidios

FC = Factor o constante de la cámara de Neubauer = 10<sup>4</sup>

FD = Factor de dilución = 10<sup>3</sup>

### L. Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados mediante la técnica de modelos lineales generalizados (GLM) con la prueba de comparación de Bonferroni, para los tratamientos. Todas las pruebas se realizaron con un nivel de confiabilidad del 95 %, empleando el software estadístico InfoStat versión 2014 (Di Rienzo et al., 2014).

## III. RESULTADOS

### A. Efecto de ixodicidas sobre el porcentaje de colonización de *M. anisopliae*

En la prueba de compatibilidad biológica de *M. anisopliae* (LaBioMt<sub>slo.tal</sub>) con los cinco ixodicidas evaluados, se observó que a partir de las 48 horas después de la siembra del hongo, el porcentaje de colonización alcanzado osciló entre 97.4 y 100.0 %, con un porcentaje de inhibición máxima de 2.6 %. Estos valores de colonización se mantuvieron constantes durante los 12 días que duró el experimento.

El modelo de varianza indicó diferencias altamente significativas para la interacción Ixodicida\*Concentración ( $p=0.0005$ ;  $F = 3.69$ ;  $gl = 8$ ) y para los factores Ixodicida ( $p<0.0001$ ;  $F = 15.47$ ;  $gl = 4$ ) y Concentración ( $p<0.0001$ ;  $F = 9.90$ ;  $gl = 3$ ). El Amitraz a las tres concentraciones evaluadas inhibió la colonización del hongo entre 1.5 y 2.6 %, al presentar valores de colonización comprendidos entre 97.4 y 98.5 % (Tabla 3). En la mezcla de Cymiazol y Cyflutrin a las

concentraciones de 155 + 24.8 y 312.5 + 50 ppm, el hongo presentó valores de colonización similares a las del Amitraz, diferenciándose significativamente del testigo. En los tratamientos formados por los ingredientes activos Flumetrina, Coumaphos y Cipermetrina, el hongo presentó una colonización comprendida entre 98.8 y 99.6 % y únicamente se observó entre 0.4 a 1.2 % de inhibición a las tres concentraciones evaluadas (Tabla 3). En el tratamiento testigo se presentó un 100 % de colonización del hongo.

Tabla III. Porcentaje de colonización de *M. anisopliae* mediante, la prueba de discos impregnados.

Concentración del ingrediente activo (ppm)	Ixodicida	Porcentaje de Colonización (%) Media ± Error estándar
83.7	Amitraz	97.4 ± 0.39 f
125.0	Amitraz	98.5 ± 0.38 b c d e f
250.0	Amitraz	97.8 ± 0.20 d e f
49.5	Cipermetrina	99.3 ± 0.22 a b c
75.0	Cipermetrina	99.1 ± 0.24 a b c
150.0	Cipermetrina	98.8 ± 0.30 a b c d e
66.0	Coumaphos	99.4 ± 0.27 a b c
100.0	Coumaphos	99.2 ± 0.23 a b c
200.0	Coumaphos	98.8 ± 0.24 a b c d e
105.0 + 16.8	Cymiazol + Cyflutrin	99.2 ± 0.24 a b c
155.0 + 24.8	Cymiazol + Cyflutrin	97.7 ± 0.18 e f
312.5 + 50.0	Cymiazol + Cyflutrin	98.4 ± 0.24 c d e f
9.9	Flumetrina	99.6 ± 0.19 a b
15.0	Flumetrina	99.0 ± 0.23 a b c d
30.0	Flumetrina	99.1 ± 0.18 a b c d
No aplica	Testigo	100.0 ± 0.00 a

Letras se leen en sentido vertical.

*B. Efecto de ixodicidas sobre la germinación de M. anisopliae*

Los valores del modelo de varianza indicaron diferencias estadísticas en la interacción Ixodicida \* Concentración del ixodicida ( $p < 0.0001$ ;  $F = 19.50$ ;  $gl = 8$ ), así como para el efecto principal Ixodicida ( $p = 0.0481$ ;  $F = 2.54$ ;  $gl = 4$ ). En la Tabla 4 se observa el comportamiento de la germinación de los conidios de *M. anisopliae* (LaBioMt<sub>slo.tal</sub>), bajo el efecto de los tratamientos, a las 48 horas después de realizada la siembra del hongo. Con el ingrediente activo Amitraz en la concentración de 250 ppm, sembrado a dos concentraciones del hongo ( $10^3$  y  $10^4$  conidios/mL) se presentaron valores UFC de  $1.1 \times 10^8$  y  $1.4 \times 10^8$  conidios/mL, respectivamente. A la concentración del 125 ppm, el hongo presentó valores de  $7.0$  y  $6.8 \times 10^7$  UFC/mL en las dos concentraciones preparadas, respectivamente. En estas dos concentraciones de Amitraz, el análisis estadístico no mostró diferencias en la germinación del hongo. A la concentración de 83.7 ppm de Amitraz el hongo presentó valores de  $2.8$  a  $4.6 \times 10^7$  UFC/mL, sin diferencias significativas entre las dos concentraciones del hongo, ni con la del Amitraz a la concentración de 125 ppm. Con los ixodicidas Flumetrina, Cipermetrina, mezcla de Cyamiazol + Cyflutrin y Coumaphos, la germinación no mostró diferencias estadísticas significativas en las tres concentraciones; sin embargo, la prueba de medias separó en dos niveles a los tratamientos, pero comparten igualdad entre ellos. Por otra parte, el testigo no presentó diferencias con los demás tratamientos (Tabla 4).

Tabla IV. Efecto de la mezcla de conidios de *M. anisopliae* con cinco ixodicidas, sobre la germinación.

Concentración del ingrediente activo (ppm)	Ixodicida	Concentración del hongo (conidios/mL)	UFC/mL Media ± Error estándar
83.7	Amitraz	10 <sup>3</sup>	4.6 x 10 <sup>7</sup> ± 8.7 x 10 <sup>6</sup> b
83.7	Amitraz	10 <sup>4</sup>	2.8 x 10 <sup>7</sup> ± 3.4 x 10 <sup>6</sup> b
125.0	Amitraz	10 <sup>3</sup>	7.0 x 10 <sup>7</sup> ± 1.4 x 10 <sup>7</sup> a b
125.0	Amitraz	10 <sup>4</sup>	6.8 x 10 <sup>7</sup> ± 2.6 x 10 <sup>6</sup> a b
250.0	Amitraz	10 <sup>3</sup>	1.1 x 10 <sup>8</sup> ± 2.2 x 10 <sup>7</sup> a b
250.0	Amitraz	10 <sup>4</sup>	1.4 x 10 <sup>8</sup> ± 1.6 x 10 <sup>7</sup> a
49.5	Cipermetrina	10 <sup>3</sup>	4.0 x 10 <sup>7</sup> ± 8.4 x 10 <sup>6</sup> b
49.5	Cipermetrina	10 <sup>4</sup>	9.1 x 10 <sup>7</sup> ± 7.8 x 10 <sup>6</sup> a b
75.0	Cipermetrina	10 <sup>3</sup>	7.2 x 10 <sup>7</sup> ± 8.0 x 10 <sup>6</sup> a b
75.0	Cipermetrina	10 <sup>4</sup>	6.7 x 10 <sup>7</sup> ± 7.4 x 10 <sup>6</sup> a b
150.0	Cipermetrina	10 <sup>3</sup>	4.2 x 10 <sup>7</sup> ± 7.3 x 10 <sup>6</sup> b
150.0	Cipermetrina	10 <sup>4</sup>	5.7 x 10 <sup>7</sup> ± 7.2 x 10 <sup>6</sup> a b
66.0	Coumaphos	10 <sup>3</sup>	9.1 x 10 <sup>7</sup> ± 1.2 x 10 <sup>7</sup> a b
66.0	Coumaphos	10 <sup>4</sup>	7.4 x 10 <sup>7</sup> ± 2.7 x 10 <sup>6</sup> a b
100.0	Coumaphos	10 <sup>3</sup>	1.0 x 10 <sup>8</sup> ± 1.6 x 10 <sup>7</sup> a b
100.0	Coumaphos	10 <sup>4</sup>	1.0 x 10 <sup>8</sup> ± 1.4 x 10 <sup>7</sup> a b
200.0	Coumaphos	10 <sup>3</sup>	3.1 x 10 <sup>7</sup> ± 7.8 x 10 <sup>6</sup> b
200.0	Coumaphos	10 <sup>4</sup>	4.5 x 10 <sup>7</sup> ± 2.9 x 10 <sup>6</sup> b
105.0 + 16.8	Cymiazol + Cyflutrin	10 <sup>3</sup>	9.3 x 10 <sup>7</sup> ± 1.6 x 10 <sup>7</sup> a b
105.0 + 16.8	Cymiazol + Cyflutrin	10 <sup>4</sup>	1.1 x 10 <sup>8</sup> ± 5.1 x 10 <sup>6</sup> a b
155.0 + 24.8	Cymiazol + Cyflutrin	10 <sup>3</sup>	5.3 x 10 <sup>7</sup> ± 1.4 x 10 <sup>7</sup> a b
155.0 + 24.8	Cymiazol + Cyflutrin	10 <sup>4</sup>	8.2 x 10 <sup>7</sup> ± 3.3 x 10 <sup>6</sup> a b
312.5 + 50.0	Cymiazol + Cyflutrin	10 <sup>3</sup>	5.1 x 10 <sup>7</sup> ± 9.7 x 10 <sup>6</sup> b
312.5 + 50.0	Cymiazol + Cyflutrin	10 <sup>4</sup>	5.4 x 10 <sup>7</sup> ± 4.0 x 10 <sup>5</sup> a b
9.9	Flumetrina	10 <sup>3</sup>	1.0 x 10 <sup>8</sup> ± 6.8 x 10 <sup>6</sup> a b
9.9	Flumetrina	10 <sup>4</sup>	9.2 x 10 <sup>7</sup> ± 5.6 x 10 <sup>6</sup> a b
15.0	Flumetrina	10 <sup>3</sup>	7.3 x 10 <sup>7</sup> ± 1.5 x 10 <sup>7</sup> a b
15.0	Flumetrina	10 <sup>4</sup>	6.9 x 10 <sup>7</sup> ± 1.3 x 10 <sup>7</sup> a b
30.0	Flumetrina	10 <sup>3</sup>	7.2 x 10 <sup>7</sup> ± 1.3 x 10 <sup>7</sup> a b
30.0	Flumetrina	10 <sup>4</sup>	5.9 x 10 <sup>7</sup> ± 3.3 x 10 <sup>6</sup> a b
No aplica	Testigo	10 <sup>3</sup>	7.2 x 10 <sup>7</sup> ± 8.7 x 10 <sup>6</sup> a b
No aplica	Testigo	10 <sup>4</sup>	7.0 x 10 <sup>7</sup> ± 1.1 x 10 <sup>6</sup> a b

Las letras se leen en sentido vertical.

C. Efecto de los ixodicidas sobre la esporulación de *M. anisopliae*

Mediante la técnica de discos impregnados de ixodicida, el modelo de varianza indicó diferencias estadísticas para la interacción Concentración\* Ixodicida (p < 0.0001; F = 5.61; gl = 8). Como complemento, se menciona que el factor Ixodicida mostró diferencias significativas entre sus niveles (p = 0.0014; F = 4.88; gl = 4), no así el factor Concentración (p = 0.6030; F = 0.62; gl = 3).



Se observó que la esporulación en el tratamiento testigo no presentó diferencias significativas con la de los ixodicidas en sus tres concentraciones (Tabla 5). En el Amitraz el hongo mostró valores de  $1.1$  a  $1.5 \times 10^6$  conidios/mL en las tres concentraciones evaluadas, sin diferencias estadísticas entre ellos. Esta misma respuesta la presentó el hongo en presencia de Cipermetrina y Coumaphos. Con la mezcla Cymiazol + Cyflutrin a las concentraciones de  $155 + 24.8$  y  $312.5 + 50$  ppm, se presentaron valores de esporulación menor ( $5.3$  a  $8.0 \times 10^5$  conidios/mL), que a la concentración de  $105$  ppm de Cymiazol y  $16.8$  ppm de Cyflutrin ( $1.3 \times 10^6$  conidios/mL). Por el contrario, se detectó que la Flumetrina a la concentración de  $15$  y  $30$  ppm, presentó la mayor esporulación, aunque la esporulación a la concentración de  $9.9$  ppm comparte igualdad estadística con la de  $15$  ppm.

Tabla V. Esporulación de *M. anisopliae* (LaBioMtslo.tal), mediante la técnica de discos impregnados.

Concentración del ixodicida (ppm)	Ixodicida	Número de conidios/mL Media ± Error estándar
83.7	Amitraz	$1.5 \times 10^6 \pm 1.7 \times 10^5$ a
125.0	Amitraz	$1.1 \times 10^6 \pm 8.4 \times 10^4$ a b c
250.0	Amitraz	$1.2 \times 10^6 \pm 1.5 \times 10^5$ a b c
49.5	Cipermetrina	$8.7 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$ a b c
75.0	Cipermetrina	$9.3 \times 10^5 \pm 2.0 \times 10^5$ a b c
150.0	Cipermetrina	$6.0 \times 10^5 \pm 8.9 \times 10^4$ b c
66.0	Coumaphos	$8.7 \times 10^5 \pm 6.7 \times 10^4$ a b c
100.0	Coumaphos	$1.1 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^5$ a b c
200.0	Coumaphos	$8.0 \times 10^5 \pm 1.8 \times 10^5$ a b c
105.0 + 16.8	Cymiazol + Cyflutrin	$1.3 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^5$ a b
155.0 + 24.8	Cymiazol + Cyflutrin	$8.0 \times 10^5 \pm 1.5 \times 10^5$ a b c
312.5 + 50.0	Cymiazol + Cyflutrin	$5.3 \times 10^5 \pm 8.4 \times 10^4$ c
9.9	Flumetrina	$5.3 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^5$ c
15.0	Flumetrina	$1.0 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^5$ a b c
30.0	Flumetrina	$1.4 \times 10^6 \pm 8.9 \times 10^4$ a
No aplica	Testigo	$9.3 \times 10^5 \pm 8.9 \times 10^4$ a b c

Las letras se leen en sentido vertical.

Mediante la técnica de la mezcla de conidios con ingredientes activos se encontraron valores comprendidos entre  $3.3 \times 10^5$  a  $1.9 \times 10^6$  conidios/mL (Tabla 6). El modelo de varianza estableció diferencias significativas para la interacción Concentración de Ixodicida \* Ixodicida \* Concentración del hongo ( $p < 0.0001$ ;  $F = 6.36$ ;  $gl = 8$ ). Como resultados adicionales, se anota que se encontraron diferencias significativas en las interacciones Concentración del hongo \* Ixodicida ( $p < 0.0001$ ;  $F = 13.97$ ;  $gl = 4$ ) y Concentración del ixodicida \* Ixodicida ( $p = 0.0001$ ;  $F = 4.20$ ;  $gl = 8$ ), no así en la interacción Concentración del hongo \* Concentración del ixodicida ( $p = 0.1193$ ;  $F = 1.98$ ;  $gl = 3$ ). Con respecto a los efectos principales, se encontraron diferencias significativas entre los diferentes niveles del factor Ixodicida ( $p < 0.0001$ ;  $F = 24.38$ ;  $gl = 4$ ), Concentración del hongo ( $p < 0.0001$ ;  $F = 24.65$ ;  $gl = 1$ ) y Concentración del Ixodicida ( $p = 0.0001$ ;  $F = 7.27$ ;  $gl = 3$ ).

Con el ixodicida Amitraz, la esporulación del hongo osciló entre  $4.0$  y  $8.7 \times 10^5$  conidios/mL; encontrándose diferencias significativas para las concentraciones de  $125$  y  $250$  ppm, a la concentración del hongo de  $10^4$  conidios/mL, con su testigo correspondiente a la siembra realizada (Tabla 6). Para la Cipermetrina, el Coumaphos, la mezcla Cymiazol + Cyflutrin y la Flumetrina, se observó un efecto similar para la mayoría de las concentraciones de los ingredientes activos y del hongo; sin embargo, la

Cipermetrina se comportó similar al Amitraz ya que en comparación con el tratamiento testigo no se encontraron diferencias significativas entre sus concentraciones. Contrario a lo anterior, en Coumaphos se obtuvo diferencias significativas en las concentraciones de 100 y 200 ppm, así como en Cymiazol + Cyflutrin a la concentración de 155.0 + 24.8 ppm, ambos tratamientos a la concentración del hongo de  $10^4$  conidios/mL. Por último, con Flumetrina se presentó diferencias estadísticas en las concentraciones de 15.0 y 30.0 ppm, a la concentración de  $1 \times 10^4$  conidios/mL del hongo y a la concentración de 30.0 ppm a  $10^3$  conidios/mL, en donde la esporulación fue estadísticamente diferente a su correspondiente testigo.

**Tabla 6.** Esporulación de *M. anisopliae*, mediante la mezcla de conidios e ingredientes activos.

Concentración del ixodicida (ppm)	Ixodicida	Concentración del hongo (conidios/mL)	Número de conidios/mL Media ± Error estándar
83.7	Amitraz	$10^3$	$5.3 \times 10^5 \pm 6.7 \times 10^4$ e f g h
83.7	Amitraz	$10^4$	$4.7 \times 10^5 \pm 8.4 \times 10^4$ f g h
125.0	Amitraz	$10^3$	$8.7 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^5$ c d e f g h
125.0	Amitraz	$10^4$	$4.0 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$ g h
250.0	Amitraz	$10^3$	$6.7 \times 10^5 \pm 6.7 \times 10^4$ d e f g h
250.0	Amitraz	$10^4$	$4.7 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^5$ f g h
49.5	Cipermetrina	$10^3$	$8.0 \times 10^5 \pm 0.0 \times 10^0$ c d e f g h
49.5	Cipermetrina	$10^4$	$1.1 \times 10^6 \pm 1.2 \times 10^5$ b c d e f g
75.0	Cipermetrina	$10^3$	$6.0 \times 10^5 \pm 2.2 \times 10^5$ d e f g h
75.0	Cipermetrina	$10^4$	$1.1 \times 10^6 \pm 8.9 \times 10^4$ b c d e f g
150.0	Cipermetrina	$10^3$	$1.0 \times 10^6 \pm 1.4 \times 10^5$ c d e f g h
150.0	Cipermetrina	$10^4$	$1.3 \times 10^6 \pm 2.7 \times 10^5$ a b c d
66.0	Coumaphos	$10^3$	$1.5 \times 10^6 \pm 8.4 \times 10^4$ a b c
66.0	Coumaphos	$10^4$	$1.2 \times 10^6 \pm 1.0 \times 10^5$ a b c d e f
100.0	Coumaphos	$10^3$	$1.2 \times 10^6 \pm 1.0 \times 10^5$ a b c d e f
100.0	Coumaphos	$10^4$	$1.0 \times 10^6 \pm 8.9 \times 10^4$ c d e f g h
200.0	Coumaphos	$10^3$	$1.8 \times 10^6 \pm 8.9 \times 10^4$ a b
200.0	Coumaphos	$10^4$	$6.7 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$ d e f g h
105.0 + 16.8	Cymiazol + Cyflutrin	$10^3$	$1.1 \times 10^6 \pm 1.6 \times 10^5$ b c d e f g
105.0 + 16.8	Cymiazol + Cyflutrin	$10^4$	$5.3 \times 10^5 \pm 8.4 \times 10^4$ e f g h
155.0 + 24.8	Cymiazol + Cyflutrin	$10^3$	$1.1 \times 10^6 \pm 6.7 \times 10^4$ b c d e f g
155.0 + 24.8	Cymiazol + Cyflutrin	$10^4$	$3.3 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^5$ h
312.5 + 50.0	Cymiazol + Cyflutrin	$10^3$	$5.3 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^5$ e f g h
312.5 + 50.0	Cymiazol + Cyflutrin	$10^4$	$1.1 \times 10^6 \pm 8.4 \times 10^4$ b c d e f g
9.9	Flumetrina	$10^3$	$1.9 \times 10^6 \pm 1.6 \times 10^5$ a
9.9	Flumetrina	$10^4$	$1.3 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^5$ a b c d e
15.0	Flumetrina	$10^3$	$1.3 \times 10^6 \pm 0.0 \times 10^0$ a b c d
15.0	Flumetrina	$10^4$	$4.0 \times 10^5 \pm 2.5 \times 10^5$ g h
30.0	Flumetrina	$10^3$	$1.1 \times 10^6 \pm 1.2 \times 10^5$ b c d e f g
30.0	Flumetrina	$10^4$	$8.0 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^5$ c d e f g h
No aplica	Testigo	$10^3$	$1.2 \times 10^6 \pm 6.7 \times 10^4$ a b c d e f
No aplica	Testigo	$10^4$	$1.3 \times 10^6 \pm 1.8 \times 10^5$ a b c d e

Las letras se leen en sentido vertical.

#### IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En la presente investigación se intentó dar respuesta a la hipótesis de que existe compatibilidad de cinco ingredientes activos de ixodicidas, de uso común para el control de *R. microplus*, con el hongo *M. anisopliae* (LaBioMt<sub>slo.tal</sub>), los resultados permiten aceptar la hipótesis de que los ingredientes activos Cipermetrina, Flumetrina y Coumaphos, no inhiben la colonización, en sus diferentes concentraciones, con respecto al testigo. Sin embargo, el Amitraz en sus tres concentraciones y con la mezcla de

Cymiazol + Cyflutrin a las concentraciones de 155.0 + 24.8 y 312.5 + 50.0 ppm respectivamente, presentaron diferencias con respecto al testigo, con hasta un 2.6 % de inhibición de la colonización del hongo.

El efecto de los cinco ixodicidas en las tres concentraciones evaluadas, mediante la técnica en mezcla con el hongo en dos concentraciones, sobre la germinación de sus conidios no presentó diferencias significativas con el testigo. Con respecto al efecto de ixodicidas sobre la esporulación del hongo se encontraron respuestas diferentes acorde a la técnica de evaluación; mediante la técnica de discos impregnados, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de ixodicidas con el testigo. Sin embargo, con la técnica de la mezcla de diferentes concentraciones de los ixodicidas, sí se observaron diferencias estadísticas entre las concentraciones de los ixodicidas y la concentración del hongo, ya que el Amitraz en sus tres concentraciones, al igual que la mezcla de 155 ppm de Cymiazol y 24.8 ppm de Cyflutrin, y Flumetrina a la concentración de 15 ppm a la concentración del hongo de  $10^4$  conidios/mL, presentaron diferencias estadísticas en contraste con el correspondiente testigo. Por el contrario, los tratamientos con los ingredientes activos Coumaphos, Flumetrina y Cipermetrina, no mostraron significancia con el testigo.

Cabe mencionar que en las dos metodologías utilizadas el comportamiento de las concentraciones de los ixodicidas en el porcentaje de colonización, germinación de conidios y esporulación de *M. anisopliae* (LaBioMt<sub>slo.tal</sub>) no se presentó un patrón homogéneo, sin embargo; se dio la excepción con el ingrediente activo Flumetrina, en el bioensayo de esporulación con la técnica de discos impregnados, presentó los mayores valores de esporulación del hongo a la concentración de 30 ppm, seguido de las concentraciones de 15 y 9.9 ppm.

Con la metodología de discos impregnados se evidenció diferencias estadísticas entre algunas concentraciones del ingrediente activo Amitraz y Cymiazol + Cyflutrin con respecto al testigo, al evaluar el porcentaje de colonización del hongo; sin embargo, en cuanto a la esporulación de *M. anisopliae* (LaBioMt<sub>slo.tal</sub>) con este método no se presentaron diferencias entre los tratamientos con el testigo. Además, al determinar las unidades formadoras de colonias por mililitro del hongo con el método de la mezcla de conidios e ingredientes activos no se presentaron diferencias estadísticas ni se afectó el potencial del agente biocontrolador *M. anisopliae* (LaBioMt<sub>slo.tal</sub>), pero sí se encontraron diferencias significativas al evaluar la esporulación del hongo. La compatibilidad encontrada del hongo con los ixodicidas podría deberse a que los ingredientes activos utilizados son acaricidas y no específicamente fungicidas o herbicidas; cabe mencionar, que algunos de estos tipos de plaguicidas son capaces de inhibir la germinación, el crecimiento, la esporulación y en algunos casos, hasta la patogenicidad de los hongos, tal como lo demuestran los trabajos de Poprawski y Majchrowicz (1995), Er y Gökçe (2004), Bahiense et al. (2006), Castellanos et al. (2011) y Silva et al. (2013).

Por su parte, Er y Gökçe (2004) reportan que concentraciones bajas de Cipermetrina y Deltametrina presentaron menor posibilidad de interferir con el hongo en comparación con los demás ingredientes activos evaluados sobre *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith. En esta investigación se presentó un comportamiento parecido al de la Cipermetrina con *M. anisopliae*, ya que no se presentaron diferencias en sus diferentes concentraciones con el testigo, con respecto al porcentaje de colonización, germinación de conidios ni en la esporulación del hongo. En otro estudio similar Sun et al. (2011) indican la compatibilidad *in vivo* de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin con el piretroide sintético Deltametrina, ingrediente activo utilizado como ixodicida para controlar la garrapata *Hyalomma anatolicum anatolicum* (Acari: Ixodidae) en China, además la combinación del acaricida + el hongo, tuvo un efecto de control más rápido que cuando fueron aplicados por separado.

Por otra parte, Wenzel et al. (2004) encontraron que los ixodicidas Deltametrina, Cipermetrina y Amitraz, evaluados en sus dosis recomendadas también son compatibles con el hongo entomopatógeno *B. bassiana* para el control de *R. microplus*. En un estudio *in vivo* realizado por Pachamuthu y Kamble

(2000) con la cucaracha *Blattella germanica* (L.), encontraron la compatibilidad de *M. anisopliae* en mezcla con el ingrediente activo Cyflutrin.

Otros reportes también ponen en evidencia la compatibilidad *in vitro* e *in vivo*, de algunos ingredientes activos del grupo de los organofosforados; así, Gurulingappa et al. (2011) reportan que el insecticida omethoato en mezcla, no afecta el crecimiento ni la germinación del hongo *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) Gams & Zare. En particular, los resultados obtenidos del efecto de los ixodicidas sobre la compatibilidad de *M. anisopliae*, también complementan los resultados de Hornbostel et al. (2005) y Jaramillo et al. (2005).

Los resultados obtenidos en la presente investigación complementan el reporte de Schumacher y Poehling (2012) en donde encontraron que se podrían utilizar cepas de *M. anisopliae*, mezcladas con pesticidas, al igual que lo reportado por Bahiense et al. (2006) quienes realizaron un estudio *in vitro*, en larvas de *R. microplus* resistentes a piretroides e indican que la mezcla de *M. anisopliae* y el ingrediente activo Deltametrina se puede utilizar en un programa de control integrado, los resultados más altos de mortalidad se presentaron con la asociación del ixodicida junto con el hongo.

Del mismo modo, sería prudente no descartar la posibilidad de investigar la compatibilidad en mezcla de *M. anisopliae* (LaBioMt<sub>slo.tal</sub>) con otras cepas u otros entomopatógenos, a fin de implementar otras alternativas al control químico de garrapatas, utilizando el control biológico. Tal como lo demuestran los resultados obtenidos por Rodríguez-Alcocer et al. (2014), quienes reportan la asociación de dos cepas de *M. anisopliae*, para el control *R. microplus*, en condiciones de campo con resultados de hasta un 72 y 87 % de control en ninfas y adultos, respectivamente.

Se recomienda realizar estudios en condiciones de invernadero y campo con el fin de evaluar de validar la compatibilidad de *M. anisopliae* (LaBioMt<sub>slo.tal</sub>) sobre ixodicidas químicas utilizados, para el control de *R. microplus*, ya que las condiciones ambientales pueden afectar el potencial biocontrolador del hongo, se ha reportado la influencia de la radiación UV-B por Rangel et al. (2005) y Rangel et al. (2008), la temperatura y la humedad relativa por Ment et al. (2010).

Los resultados demuestran que existe compatibilidad entre los ingredientes activos Flumetrina, Cipermetrina, Coumaphos, en la mayoría de sus concentraciones con *M. anisopliae* (LaBioMt<sub>slo.tal</sub>), esto concuerda con los resultados obtenidos por Leal et al. (2003), quienes comentan que la combinación de productos químicos con biológicos podrían utilizarse como herramienta para el control de la garrapata del ganado. En ese sentido, los datos obtenidos en este estudio, demuestran la factibilidad de la utilización de ixodicidas químicos a bajas concentraciones en mezcla con el hongo *M. anisopliae* como una alternativa para el control de la garrapata, lo anterior, permitirá reducir costos económicos de control y disminuir la cantidad de residuos químicos, en los derivados cárnicos y en la leche, así como en el medio ambiente; además, de mejorar la eficiencia al implementarse dentro de un programa de manejo integrado de esta plaga, tal como lo mencionan Soares y Monteiro (2011) y Schumacher y Poehling (2012). Por otro lado, de acuerdo con Hassan y Charnley (1989) y Hironori y Nishigaki (2001) la utilización de pesticidas a bajas concentraciones junto con hongos entomopatógenos, podría ser necesario, para mejorar la patogenicidad y con ello suprimir la respuesta a la resistencia causada por el uso irracional de ixodicidas.

## RECONOCIMIENTOS

Se le agradece al Programa de Pasantías para la Movilidad Estudiantil con Fondos del Sistema CONARE del Instituto Tecnológico de Costa Rica, por la beca otorgada al primer autor para la realización de la pasantía en el Laboratorio de Control Biológico no. 1 de Patología de Insectos y Ácaros de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima, México.

## REFERENCIAS

- [1] Abbas, R. Z., Zaman, M. A., Colwell, D.D., Gilleard, J. y Iqbal, Z. (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary Parasitology*, 203, 6-20.
- [2] Alonso-Díaz, M. A., Rodríguez-Vivas, R. I., Fragoso-Sánchez, H. y Rosario-Cruz, R. (2006). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(2), 105-113.
- [3] Alonso-Díaz, M. A., García, L., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., Ángel-Sahagún, C. A., Rodríguez-Vivas, R. I. y Fragoso-Sánchez, H. (2007). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 147, 336-340.
- [4] Anderson, J. F. (2002). The natural history of ticks. *Medical Clinics of North America*, 86, 205-218.
- [5] Anderson, J. F. y Magnarelli, L. A. (2008). Biology of ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22, 195-215.
- [6] Antunes, S., Merino, O., Lérias, J., Domingues, N., Mosqueda, J., de la Fuente, J. y Domingos, A. (2015). Artificial feeding of *Rhipicephalus microplus* female ticks with anti calreticulin serum do not influence tick and *Babesia bigemina* acquisition. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 6, 47-55.
- [7] Bahiense, T. C., Fernandes, É. K. K. y Bittencourt, V. R. E. P. (2006). Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. *Veterinary Parasitology*, 141, 319-324.
- [8] Bravo, M. J., Coronado, A. y Henríquez, H. (2008). Eficacia *in vitro* del amitraz sobre poblaciones de *Boophilus microplus* provenientes de explotaciones lecheras del estado Lara, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 26(1), 35-40.
- [9] Castellanos, G. L., Muiño, G. B. L., Lorenzo, N. M. E., Rodríguez, F. A. y Gómez, A. M. (2011). Efecto *in vitro* de siete fungicidas químicos sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. *Fitosanidad*, 15(1), 31-38.
- [10] Castro-Janer, E., Rifran, L., González, P., Niell, C., Piaggio, J., Gil, A. y Schumaker, T. T. S. (2011). Determination of the susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to ivermectin and fipronil by Larval Immersion Test (LIT) in Uruguay. *Veterinary Parasitology*, 178, 148-155.
- [11] Cortés, J. A. (2010). Cambios en la distribución y abundancia de las garrapatas y su relación con el calentamiento global. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 57(1), 48-58.
- [12] Cortés, V. J. A., Betancourt, E. J. A., Argüelles, C. J. H. y Pulido, H. L. A. (2010). Distribución de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos y fincas del Altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(1), 73-84.
- [13] Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. W. (2014). *InfoStat versión 2014*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- [14] Er, M. K. y Gökçe, A. (2004). Effects of selected pesticides used against glasshouse tomato pests on colony growth and conidial germination of *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biological Control*, 31, 398-404.
- [15] Estrada-Peña, A., García, Z. y Fragoso-Sánchez, H. (2006a). The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico. *Experimental and Applied Acarology*, 38, 307-316.
- [16] Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J. -L., Guglielmone, A., Horak, I., Jongejan, F., Latif, A., Pegram, R. y Walter, A. R. (2006b). The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental and Applied Acarology*, 38, 219-235.
- [17] Fernandes, É. K. K. y Bittencourt, V. R. E. P. (2008). Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Experimental of Applied Acarology*, 46, 71-93.
- [18] Fernandes, É. K. K., Angelo, I. C., Rangel, D. E. N., Bahiense, T. C., Moraes, A. M. L., Roberts, D. W. y Bittencourt, V. R. E. P. (2011). An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 182, 307-318.

- [19] Fernandes, É. K. K., Bittencourt, V. R. E. P. y Roberts, D. W. (2012). Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Experimental Parasitology*, 130, 300-305.
- [20] Fernández, R. M., Berlanga, P. A. M., Cruz, V. C. y Hernández, V. V. M. (2010). Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la inhibición de oviposición, eclosión y potencial reproductivo en una cepa triple resistente de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). *Entomotropica*, 25(3), 109-115.
- [21] Fernández-Ruvalcaba, M., Zhioua, E. y García-Vázquez, Z. (2005). Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Boophilus microplus* sensible y resistente a los organofosforados. *Técnica Pecuaria en México*, 43(3), 433-440.
- [22] Frazzon, G. A. P., Vaz Jr, I. S., Masuda, A., Schrank, A. y Vainstein, H. M. (2000). *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 94, 117-125.
- [23] Gruner, L. (1973). Sensibilisation des larves de *Phyllophaga pleei* Bl. et de *P. patrueloides* Pa. (Coleoptera: Scarabaeidae) a la mycose a *Metarhizium anisopliae* Sorokin au moyen d'une faible dose d'insecticide ou d'un autre agent infectieux. *Annales de Zoologie Ecologie Animale*, 5(3), 335-349.
- [24] Gurulingappa, P., Mc Gee, P. y Sword, G. A. (2011). *In vitro* and *in planta* compatibility of insecticides and the endophytic entomopathogen, *Lecanicillium lecanii*. *Mycopathologia*, 172, 161-168.
- [25] Hassan, A. E. M. y Charnley, A. K. (1989). Ultrastructural study of the penetration by *Metarhizium anisopliae* through dimilin-affected cuticle of *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54, 117-124.
- [26] Hiromori, H. y Nishigaki, J. (2001). Factor analysis of synergistic effect between the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and synthetic insecticides. *Applied Entomology and Zoology*, 36(2), 231-236.
- [27] Hornbostel, V. L., Zhioua, E., Benjamin, M. A., Ginsberg, H. S. y Ostfeld, R. S. (2005). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) and permethrin to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) nymphs. *Experimental and Applied Acarology*, 35, 301-316.
- [28] Jaramillo, J., Borgemeister, C., Ebssa, L., Gaigl, A., Tobón, R. y Zimmermann, G. (2005). Effect of combined applications of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain CIAT 224 and different dosages of imidacloprid on the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae). *Biological Control*, 34, 12-20.
- [29] Jonsson, N. N., Miller, R. J., Kemp, D. H., Knowles, A., Ardila, A. E., Verrall, R. G. y Rothwell, J. T. (2010). Rotation of treatments between spinosad and amitraz for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations with amitraz resistance. *Veterinary Parasitology*, 169, 157-164.
- [30] Kassab, S. O., Loureiro, E. S., Rossoni, C., Pereira, F. F., Barbosa, R. H., Costa, D. P. y Zanuncio, J. C. (2014). Combinations of *Metarhizium anisopliae* with chemical insecticides and their effectiveness in *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) control on sugarcane. *Florida Entomologist*, 97(1), 146-154.
- [31] Leal, T. A., de Freitas, J. D. R. y Vaz Jr, I. S. (2003). Perspectivas para o controle do carrapato bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*, 31(1), 1-11.
- [32] Lew-Tabor, A. E., Bruyeres, A. G., Zhang, B. y Rodriguez, V. M. (2014). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick *in vitro* feeding methods for functional (dsRNA) and vaccine candidate (antibody) screening. *Ticks and Ticks-borne Diseases*, 5, 500-510.
- [33] Lezama, G. R. y Munguía, R. A. (1990). Evaluación de cinco sustratos en la multiplicación masiva de tres cepas de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. y su virulencia sobre *Spodoptera frugiperda*. En Smith, J. E. (Ed.). *Proceedings of the XIII Reunión Nacional de Control Biológico, Colima, México*, octubre.
- [34] Loureiro, De S. E., Moino Jr., A., Arnosti, A. y de Souza, C. G. (2002). Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. *Neotropical Entomology*, 31(2), 263-269.

- [35] Manjunathachar, H. V., Saravanan, B. C., Kesavan, M., Karthik, K., Rathod, P., Gopi, M., Tamilmahan, P. y Balaraju, B. L. (2014). Economic importance of ticks and their effective control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(Suppl.2), S770-S779.
- [36] Mendes, M. C., Pereira, J. R. y Prado, A. P. (2007). Sensitivity of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to pyrethroids and organophosphate in farms in the Vale do Paraíba Region. São Paulo. Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 74(2), 81-85.
- [37] Ment, D., Gindin, G., Glazer, I., Perl, S., Elad, D. y Samish, M. (2010). The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. *Fungal Biology*, 114, 49-56.
- [38] Muro, C. F., Cruz-Vázquez, C., Fernández-Ruvalcaba, M., Molina-Torres, J., Soria, C. J. y Ramos, P. M. (2003). Repellence of *Boophilus microplus* larvae in *Stylosanthes humilis* and *Stylosanthes hamata* plants. *Parasitology Latinoamerica*, 58, 118-121.
- [39] Neves, P. M. O. J., Hirose, E., Tchujo, P. T. y Moino Jr, A. (2001). Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. *Neotropical Entomology*, 30(2), 263-268.
- [40] Obregón, M. (2000). Protocolo para la producción de hongos antagonistas del género *Trichoderma* sp. mediante fermentación en substratos sólidos. En *Perspectives and limitations of biotechnology in developing countries*. (2000, San José, CR). Memoria 24-28 Ene. 180 p.
- [41] Ojeda-Chi, M. M., Rodríguez-Vivas, R. I., Galindo-Velasco, E. y Lezama-Gutiérrez, R. (2010). Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 170, 348-354.
- [42] Ojeda-Chi, M. M., Rodríguez-Vivas, R. I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R. y Cruz-Vázquez, C. (2011). Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae): Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 2(2), 177-192.
- [43] Ostfeld, R. S., Price, A., Hornbostel, V. L., Benjamin, M. A. y Keesing, F. (2006). Controlling ticks and tick-borne zoonoses with biological and chemical agents. *BioScience*, 56(5), 383-394.
- [44] Pachamuthu, P. y Kamble, S. T. (2000). *In vivo* study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain Esc-1 with sublethal doses of chlorpyrifos, propetamphos, and cyfluthrin against german cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, 93(1), 60-70.
- [45] Parizi, L. F., Pohl, P. C., Masuda, A. y Vaz Jr, I. S. (2009). New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18(1), 1-7.
- [46] Pérez, E., Holmann, F., Schuetz, P. y Fajardo, E. (2006). *Evolución de la ganadería bovina en países de América Central: Costa Rica, Guatemala, Honduras y Nicaragua*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), International Livestock Research Institute (ILRI). Cali, CO. 46 p.
- [47] Polar, P., Kairo, M. T. K., Peterkin, D., Moore, D., Pegram, R. y Sally-Ann, J. (2005a). Assessment of fungal isolates for development of a myco-acaricide for cattle tick control. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 5(3), 276-284.
- [48] Polar, P., de Muro, M. A., Kairo, M. T. K., Moore, D., Pegram, R., Sally-Ann, J. y Roach-Benn, C. (2005b). Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. *Veterinary Parasitology*, 134, 159-167.
- [49] Poprawski, T. J. y Majchrowicz, I. (1995). Effects of herbicides on *in vitro* vegetative growth and sporulation of entomopathogenic fungi. *Crop Protection*, 14(1), 81-87.
- [50] Rajput, Z. I., Hu, Song-hua., Chen, Wan-jun., C., Arijó, A. G. y Xiao, Chen-wen. (2006). Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. *Journal of Zhejiang University Science B*, 7(11), 912-921.

- [51] Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., Anderson, A. J. y Roberts, D. W. (2005). Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88, 116-125.
- [52] Rangel, D. E. N., Anderson, A. J. y Roberts, D. W. (2008). Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycological Research*, 112, 1362-1372.
- [53] Rodríguez-Alcocer, U. J., Rodríguez-Vivas, R. I., Ojeda-Chi, M. M., Galindo-Velasco, E. y Lezama-Gutiérrez, R. (2014). Eficacia de la mezcla de dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) para el control de *Rhipicephalus microplus* en infestaciones naturales en bovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17, 223-229.
- [54] Rodríguez-Vivas, R. I., Alonso-Díaz, M. A., Rodríguez-Arévalo, F., Fragoso-Sánchez, H., Santamaría, V. M. y 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, México. *Veterinary Parasitology*, 136, 335-342.
- [55] Rodríguez-Vivas, R. I., Rodríguez-Arevalo, F., Alonso-Díaz, M. A., Fragoso-Sanchez, H., Santamaria, V. M. y Rosario-Cruz, R. (2006b). Prevalence and potential risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms in the State of Yucatan, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, 75, 280-286.
- [56] Rodríguez-Vivas, R. I., Rivas, A. L., Chowell, G., Fragoso, S. H., Rosario, C. R., García, Z., Smith, S. D., Williams, J. J. y Schwager, S. J. (2007). Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico. *Veterinary Parasitology*, 146, 158-169.
- [57] Rosado-Aguilar, J. A., Rodriguez-Vivas, R. I., García-Vazquez, Z., Fragoso-Sanchez, H., Ortiz-Najera, A. y Rosario-Cruz, R. (2008). Development of amitraz resistance in field populations of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) undergoing typical amitraz exposure in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 152, 349-353.
- [58] Schumacher, V. y Poehling, H.-M. (2012). *In vitro* effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Biology*, 116(1), 121-132.
- [59] Silva, R. A., Quintela, E. D., Mascarin, G. M., Barrigossi, J. A. F. y Lião, L. M. (2013). Compatibility of conventional agrochemicals used in rice crops with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Scientia Agricola*, 70(3), 152-160.
- [60] Soares, F. B. y Monteiro, A. C. (2011). Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* com carrapaticidas químicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 78(3), 385-391.
- [61] Sonenshine, D. E. y Roe, R. M. (2013). *Biology of ticks*. United States of America: Oxford University.
- [62] Sun, M., Ren, Q., Liu, Z., Guan, G., Gou, H., Ma, M., Li, Y., Liu, A., Yang, J., Yin, H. y Luo, J. (2011). *Beauveria bassiana*: Synergistic effect with acaricides against the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, 128, 192-195.
- [63] Wall, R. y Shearer, D. (2001). *Veterinary ectoparasites: biology, pathology and control*. United States of America: Blackwell Science.
- [64] Wenzel, I. M., Barci, L. A. G., Almeida, J. E. M., Gassen, M. H. y Prado, A. P. (2004). Compatibilidade do fungo *Beauveria bassiana* com carrapaticidas químicos utilizados no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, 71, 643-645.