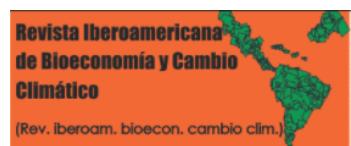


Patogenicidad in vitro de cepas de *Metarhizium anisopliae* en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

In vitro pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* strains in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Galvez, Arely Bautista; González Cortés, Nicolás; Gómez Vázquez, Armando; Editor Academico Dr. Byron Flores



Arely Bautista Galvez

arely.galvez@unach.mx

Universidad Autónoma de Chiapas, Mexico

Nicolás González Cortés

nicolas.gonzalez@ujat.mx

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Mexico

Armando Gómez Vázquez

armadoujat@outlook.com

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Mexico

Editor Academico Dr. Byron Flores

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, CEVEDI, Nicaragua

CEVEDI, Nicaragua

Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-Managua, Nicaragua

ISSN-e: 2410-7980

Periodicidad: Semestral
vol. 7, núm. 13, 2021

czuniga@ev.unanleon.edu.ni

Recepción: 23 Octubre 2020

Aprobación: 08 Abril 2021

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/394/3941760004/index.html>

DOI: <https://doi.org/10.5377/ribcc.v7i13.11271>

Autor de correspondencia: nicolas.gonzalez@ujat.mx

Resumen: Las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* representan un problema fuerte en los sistemas de producción bovina en el trópico húmedo mexicano. Para su control se aplican varios productos químicos con implicaciones negativas como bioresistencia, altos costos, impacto ambiental y riesgos en la salud de las personas que consumen leche y carne que pueden contener residuos. El objetivo de esta investigación fue evaluar la patogenicidad in vitro de las cepas MM0801 y CD0804 de *Metarhizium anisopliae* sobre garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Se evaluaron cinco concentraciones 3x10⁴, 3x10⁵, 3x10⁶, 3x10⁷, 2.6x10⁸ de conidios/ml de *M. anisopliae* sobre garrapatas en estado adulto recolectadas vivas de bovino de la cuenca lechera de Catazajá, Chiapas, México. Las garrapatas fueron susceptibles al hongo entomopatógeno encontrando una mortalidad del 50 % donde la Concentración Letal Media obtenida fue de 6.58 x 10⁶ conidios/ml de la cepa MM0801. Se concluye que *M. anisopliae* influye en el grado de virulencia de la garrapata, lo cual puede ser una alternativa de control biológico de la garrapata en el trópico húmedo mexicano.

Palabras clave: Bioacaricida, Ectoparásito, in vitro, cepa-MM0801, cepa-CD0804.

Abstract: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks represent a strong problem in cattle production systems in the Mexican humid tropics. For the control, various chemical products are applied with negative implications such as high costs, bio-resistance, environmental impact and residues in milk and meat. The objective of this research was to evaluate the in vitro pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* strains MM0801 and CD0804 on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. Five concentrations 3x10⁴, 3x10⁵, 3x10⁶, 3x10⁷, 2.6x10⁸ of conidia per ml of *M. anisopliae* were evaluated on ticks in adult stage collected live from cattle from the dairy basin of Catazajá, Chiapas, Mexico. Ticks were susceptible to the entomopathogenic fungus, finding a mortality of 50% where the mean lethal concentration obtained was 6.58x10⁶ conidia per ml of strain MM0801. It is concluded that *M. anisopliae* has high pathogenicity on the tick, which may be an alternative for the biological control of the tick in the humid Mexican tropics.



Keywords: Bioacaricide, Ectoparasite, in vitro, MM0801, CD0804.

INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* es el ectoparásito de mayor implicación económica en los sistemas de producción de ganado bovino en zonas tropicales y subtropicales del mundo (Ojeda-Chi et al., 2011). Estos parásitos hematófagos son causantes de trasmisión de enfermedades como la *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale*, además de ocasionar daños a la piel y disminución en la producción de carne, leche (Baruch, 2012). Para su control químicos se invierten más 2500 millones de dólares anualmente a nivel global (Lew-Tabor et al., 2014). Además los productos químicos tienen otras limitantes como son: el impacto ambiental, bioresistencia de algunas poblaciones y riesgos en la salud de las personas por el consumo de carne y lácteos con residuos de químicos. En México se han registrado 82 especies de garrapatas tanto en animales silvestres como domésticos. La dinámica poblacional de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* en los estados de Chiapas y Tabasco se presenta durante todo el año, donde las medidas de control consisten en aplicaciones de acaricidas químicos dirigidos a la fase adulta, lo cual implica muchas limitantes económicas, ambientales y seguridad alimentaria. Los medios para el control de la garrapata son diversos ixodicidas como los arsenicales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, formamidas, piretroides sintéticos (flumetrina), lactonas acrocíclicas (eprinomectina), fenilpirazoles (fipronil), así como algunos reguladores del crecimiento como los análogos de la hormona juvenil (metopreno y fenoxicarb) y los inhibidores de la síntesis de quitina, como el fluazurón, diflubenzurón, lufenurón y la ciromazina (Cordero et al., 1999; Cuore et al., 2008 y Rodríguez et al., 2010 citados por Bautista et al (2017). La mayoría de estos ixodicidas han sido utilizados con buenos resultados en el control de las garrapatas; sin embargo, su uso continuo e irracional ha generado cepas resistentes, así como incremento en los costos de producción, como ha ocurrido en la región de la Cuenca Lechera de Catazajá (CLC), Chiapas y Tabasco, (Monroy et al., 2016). Debido a la demanda de alimentos libres de residuos químicos y el cuidado del ambiente, surge la necesidad de buscar alternativas no químicas para control de garrapatas. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad patógena de dos cepas de *Metarhizium anisopliae* en garrapatas bajo condiciones de laboratorio; obteniendo resultados que puedan ser extrapolados a campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio:

El proyecto de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad Maya de Estudios Agropecuarios de la Universidad Autónoma de Chiapas, localizado en el km 4, carretera Catazajá - Palenque, Chiapas, con coordenadas de 17°40'39.77" N y 92°01'34.18" O. Estas regiones se caracterizan por presentar clima cálido-húmedo con lluvias de mayo a diciembre, una precipitación pluvial de 2322 milímetros al año y la temperatura fluctúa entre los 22° C a 36° C, siendo 24.5° C la temperatura media anual.

NOTAS DE AUTOR

nicolas.gonzalez@ujat.mx



Cepas de *Metarhizium anisopliae*

Las cepas de *M. anisopliae* identificadas como MM0801 y CD0804 obtenidas a partir de aislados de moscas pintas (*Aeneolamia postica*) de la caña de azúcar (*Saccharum spp.*) y larvas de polilla de la cera (*Galleria melonella*). Ambas cepas de *M. anisopliae* fueron reactivadas sobre broca del café (*Hypothenemus hampei*).

Caracterización fisiológica y morfológica de los aislamientos.

a) **Recolecta de broca de café adultos (*H. hampei*).** Primero se recolectaron en áreas cafetaleras del sur de Chiapas, los insectos fueron colocados en cajas de Petri estériles, para poder trasladarlos al laboratorio donde se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio al 0.5 % durante 5 min, después se lavaron tres veces con abundante agua destilada estéril, colocándose en gasas estériles para eliminar el exceso de humedad y posteriormente dejarlos en cajas Petri estériles.

b) **Inoculación de *Metarhizium*.** Las brocas del café se inocularon por inmersión durante 1 minutos en 100 ml con la suspensión del hongo *M. anisopliae* a una concentración de 1×10^8 conidios/ml, posteriormente se colocaron en cajas Petri con papel filtro esterilizado húmedo para facilitar el desarrollo del hongo sobre el insecto. Después de ocho días, el hongo se desarrolló completamente en el cuerpo de *H. hampei*, las cuales se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) usando 39 g en 1 L de agua y esterilizado en autoclave a 121 °C a 15 libras de presión durante 15 minutos.

c) **Colecta de garrapatas adultas.** Las garrapatas fueron colectadas de bovinos infestados de ranchos ganaderos de la cuenca lechera de Catazajá, Chiapas. Se recolectaron en promedio de 1000 adultas, de las cuales se seleccionaron al azar 60 garrapatas por concentración utilizando un total de 420.

d) **Determinar la Concentración Letal Media (CL-50).** Para la evaluación de la patogenicidad in vitro de la cepa MM0801 y CD0804 de *M. anisopliae* en garrapatas adultas, se empleó un diseño experimental completamente al azar con seis repeticiones, cada réplica con 10 garrapatas adultas (60 garrapatas por tratamiento), los resultados fueron analizados con un ANOVA y Tukey ($P \leq 0.05$). Los tratamientos consistieron en evaluar las dos cepas de *M. anisopliae* (MM0801 y CD0804) en concentraciones de 3×10^4 , 3×10^5 , 3×10^6 , 3×10^7 , 2.6×10^8 esporas/ mililitro de cada cepa, éstas comparadas con un testigo absoluto que consistió en agua destilada estéril con Tween 80° y un testigo relativo con Amitraz® (*N"*-metilbis(2,4-xililimino-metilamina) (Cuadro 1), producto químico comúnmente utilizado por los ganaderos para el control de la garrafa. Para realizar el conteo de esporas y establecer la línea de concentraciones de esporas por tratamiento, se realizó una solución de esporas, se pasó al conteo de conidios en la cámara de Neubauer (Goettl e Inglis, 1997), donde se obtuvo una concentración de solución madre de 2.6×10^8 conidios/ ml y a partir de esta concentración obtenida, se realizó las diluciones de esporas en Abdeherente ADE más Tween 80 al 0.03 %.

CUADRO 1.

Diseño experimental completamente al azar para evaluar la patogenicidad in vitro de la cepa MM0801 y CD0804 de *Metarhizium anisopliae* en garrapatas adultas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el sureste de México.

Dosis	No. Repeticiones	No. Garrapatas vivas
3 x 10 ⁴	6	60
3 x 10 ⁵	6	60
3 x 10 ⁶	6	60
3 x 10 ⁷	6	60
2.6 x 10 ⁸	6	60
Testigo absoluto (Agua)	6	60
Testigo relativo	6	60
Amitraz*		
Total		420

e) **Índice de virulencia.** Se evaluó la mortalidad de garrapatas cada 24 horas después de la inoculación, que consistió en sumergir las garrapatas en la solución de esporas por un minuto. Se contaron las garrapatas muertas y fueron expuestas en cámara húmeda, posteriormente se tomaron datos de virulencia. La cámara húmeda consistió en cajas de Petri estériles con algodón húmedo y fueron selladas con Parafilm.

f) **Capacidad de germinación.** Se evaluó la capacidad germinativa de las cepas MM0801 y CD0804, el procedimiento consistió en inocular alícuotas de 5 µl en cajas Petri con 10 ml de medio de cultivo PDA. Se marcó la cara posterior externa de las cajas Petri con 7 puntos correspondientes a los lugares donde se depositaron las alícuotas; posteriormente, se incubaron durante 36 horas a temperatura ambiente (30 ± 2), tiempo después del cual se adicionó una gota de azul de lacto fenol con el fin de suspender el proceso de germinación y teñir las esporas. Los puntos de inoculación se contaron en cuadrados, se transfirieron a láminas portaobjetos y se cubrió con una laminilla para proceder al recuento. La observación microscópica se realizó con un aumento de 40X, determinando la germinación en cinco campos microscópicos/alícuota, totalizando las esporas germinadas y no germinadas; los resultados se expresaron en porcentaje de esporas germinadas por repetición, para cada cepa se utilizaron cinco cajas Petri por repetición.

g) **Viabilidad de las esporas.** Se prepararon cajas Petri de 60 mm de diámetro con medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud (ADS), agregando de 12 a 15 ml del medio de cultivo; Se preparó una suspensión de esporas de 2.6×10^8 conidios/ml agitándose hasta obtener una suspensión homogénea; Posteriormente se realizaron diluciones, tomando 1 ml de la solución de esporas y fue colocado en un frasco con 9 ml Tween 20 al 0.03 %; agregando 50 µl de la solución de esporas en cinco puntos de la caja de Petri con ADS. Se incubó la caja Petri previamente inoculada con el hongo a 27 ± 1 °C por 12 a 24 h; Consecutivamente se observó al microscopio óptico en el objetivo 40X, agregando una gota de lactofenol azul con un algodón para detener el desarrollo de los conidios y contar 300 conidios, registrando las esporas germinadas y no germinadas; el criterio a considerar un conidio como germinado es que su tubo germinativo sea igual o mayor que el tamaño del conidio (Alatorre, 2009). Se contó un total de 8 cajas por aislamiento dando un total 16 cajas evaluadas; Posteriormente se realizó un promedio y se calculó el porcentaje de germinación.

Crecimiento radial

Se tomaron fragmentos del hongo *M. anisopliae* que tenían un crecimiento de ocho días en medio de cultivo PDA. El tamaño del fragmento fue de 0.5 X 0.5 cm y estos aislamientos fueron colocados en el centro de la caja Petri con medidas de 15 x 60 mm. El material se incubó a temperatura ambiente (30°C) y se midió el

crecimiento radial con un calibre Vernier cada 24 horas a partir de la inoculación. El diámetro de la colonia se expresó en milímetros. Para la evaluación de esta variable, se usó un diseño completamente aleatorio con cinco repeticiones para cada cepa, dando un total de 10 cajas Petri.

Caracterización morfológica

La determinación de las características morfológicas como color, aspecto de la colonia, formación de cinemas, producción y difusión de pigmento de las cepas seleccionadas se basó en la observación macroscópica de las colonias. El procedimiento consistió en inocular alícuotas de 5 μl en el centro de 10 cajas Petri con 10 ml de PDA sin acidificar, incubando a temperatura ambiente por 30 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Reactivación de *Metarhizium anisopliae*

En la reactivación de *Metarhizium anisopliae* de la cepa MM0801 y CD0804 sobre la broca de café *Hypothenemus hampei* cinco días post inoculación se obtuvo resultados de esporulación del hongo en el cuerpo del insecto, con un 80% de germinación.

Selección de aislamiento de *Metarhizium anisopliae*.

Las dos cepas de *Metarhizium anisopliae* MM0801 y CD0804 de la región, fueron reactivadas en broca de café (*Hypothenemus hampei*), las cepas presentaron crecimiento a los 8 días de haber inoculado en medios de cultivo PDA (Agar Dextrosa Papa).

Virulencia.

Los resultados que se obtuvieron en la toma de datos del experimento de la determinación de CL50 para conocer la virulencia del hongo *Metarhizium anisopliae* sobre la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* fueron analizados con Probit. La determinación de la CL50 fue calculada con una solución de 2.6 x10⁸ de la cepa MM0801 y de la CD0804 con una solución de 5.28 x 10⁸, en la figura 1 se observa garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* micosada con las dosis obtenidas del hongo *Metarhizium anisopliae* en esta investigación.



FIGURA 1.
Garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* micosada
por *Metarhizium anisopliae*. Foto propia de Bautista G.A.

En el cuadro 2 se observa los datos de mortalidad encontrada, corregida y esperada de las cepas MM0801 y CD0804 sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, estos indican que la segunda cepa mencionada fue la que obtuvo mejores resultados. Por otro lado, la Concentración Letal Media (CL50) para la cepa MM0801 de *Metarhizium anisopliae* fue de 6.58×10^6 conidios/ml mientras que para la cepa CD0804 fue de 8.87×10^5 conidios/ml, en ambos casos se evaluaron los datos a los siete días post-inoculación, con intervalos de confianza del 95%. Se menciona que la cepa CD0804 obtuvo mejor resultado debido a que a menor concentración se logra alcanzar su CL50 a diferencia con la cepa MM0801 que fue a mayor concentración para encontrar su CL50, posiblemente esto se deba a la caracterización genética que presenta cada cepa como lo menciono Bautista et al., 2012, lo cual no coincide como se ha descrito en otro estudio que determinaron un CL50 con una concentración de 106 y 108 conidios/ml, siendo esta mayor a la se obtuvo en el presente estudio Melo et al.,(2006).

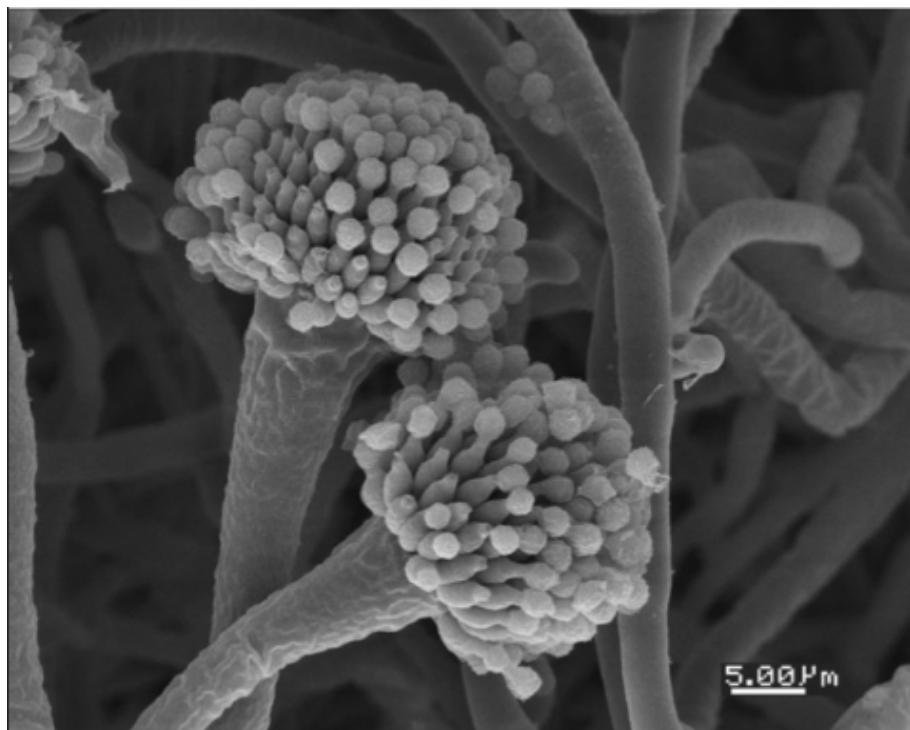
CUADRO 2.
Datos de mortalidad de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
a los siete días post-inoculación y Concentración Letal Media (CL50).

Aislamiento	% Mortalidad encontrada	% Mortalidad Corregida	% Mortalidad Esperada	X2 Calculada	CL50
MM0801	50.66	19.99	30.45	.928	6.58×10^6
CD0804	57.33	20	34.45	5.030	8.87×10^5

Bazán (2002), evaluó el hongo *Beauveria bassiana* y encontró un porcentaje de mortalidad a los siete días de 82.5 % con una concentración de 3200 ppm, siendo mayor en comparación con el presente estudio, posiblemente se puede atribuir a las condiciones del hongo y las concentraciones que se utilizaron. Por lo que se recomienda evaluar a *Beauveria bassiana* en la región de los Ríos del estado de Tabasco. La diferencia de los resultados obtenidos en la Concentración Letal Media probablemente se deba al tipo de insecto hospedero donde fue aislado, la distribución geográfica de las cepas o las variaciones genéticas.

Germinación

Se encontró que la cepa MM0801 presenta una germinación 87.84% a las 18 horas en comparación a la cepa CD0801 que tuvo una germinación del 74.56%, mientras que a las 24 horas se observó que la cepa MM0801 presenta un 100% de germinación en comparación con la cepa CD0804 que presento un 80.54%. En otros estudios por Bautista-Galvez et al., (2012), obtuvieron un porcentaje de germinación de conidios del 92% de la cepa MM0801 a las 24 horas en comparación con este trabajo que se obtuvo un 100% de germinación, posiblemente se deba a que esta cepa fue reactivada (figura2).



Crecimiento radial

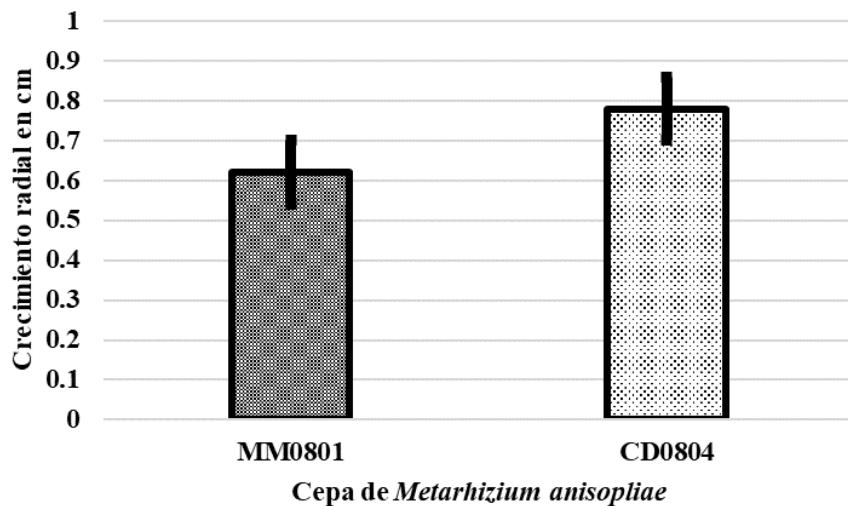


FIGURA 3.

Crecimiento radial de *Metarhizium anisopliae* en 48 horas a partir de la inoculación en garrapapa

En la figura 3 Se observa que el crecimiento radial en medio de cultivo con PDA para la cepa MM0801 fue de 0.62 cm a las 48 horas en comparación a la cepa CD0804 que tuvo un crecimiento de 0.78 cm. Por lo que la diferencia entre cepa fue de 0.1 cm. Elósegui et al., (2003), evaluaron crecimiento radial de cepas de *Metarhizium anisopliae* en medio de cultivo ADS, encontrando diferencias significativas fluctuando entre 31 y 37 mm en comparación a este trabajo que vario muy poco, estos autores evaluaron crecimiento radial de hongos entomopatógenos y no mostraron diferencia significativa entre las cepas con el medio ADS.

Se muestra que la diferencia entre cepa fue de 0.2 cm. En comparación al trabajo de Ruiz-Sánchez et al., (2011), que evaluaron crecimiento radial obteniendo resultados que variaron de 0.31 a 0.37 cm. Sin embargo, la cepa MM0801 en las primeras 96 horas mostro un crecimiento lento con un promedio de crecimiento por día de 1.4 cm, esta diferencia numérica no impacto en las pruebas de virulencia ya que la cepa MM0801 fue la más agresiva.

En cuanto a la caracterización morfológica y el color de las cepas de *Metarhizium anisopliae* en el medio de cultivo ADS (Agar Dextrosa Sabouraud) a los tres días de haberse inoculado, presentaron una coloración rosada de acuerdo con García Gutiérrez et al., (2006) esto posiblemente se deba al contenido de metabolitos extracelulares y actividad enzimática que se lleva a cabo durante el desarrollo del micelio. Sin embargo, estas cepas al momento de inocular presentaron una coloración para la cepa MM0801 verde oscuro y para la cepa CD0804 presento una coloración oliva-amarillo, esto coincide a Bautista-Galvez et al., (2012).

CONCLUSIONES

Metarhizium anisopliae infecta las poblaciones de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* con las cepas MM0801 con una CL50 de 6.48×10^6 conidios/ml y CD0804 con una CL50 de 8.87×10^5 conidios/ml. El crecimiento radial de las cepas MM0801 y CD0804 de *Metarhizium anisopliae* con el medio de cultivo PDA mostraron un crecimiento similar para ambas cepas. La viabilidad de conidios con la cepa MM0801 influyó en el grado de virulencia de un 30.45% y con la cepa CD0804 un 34.45% en la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento a la Facultad Maya de Estudios Agropecuarios de la Universidad Autónoma de Chiapas por su apoyo brindado en la elaboración de este proyecto, a la Fundación Produce Tabasco por el financiamiento otorgado para la ejecución del presente trabajo y agradecemos profundamente a los productores ganaderos de la Cuenca Lechera de la región de Catazajá por la facilitación de sus potreros y animales para el muestreo de la garrapata. Al Cuerpo Académico: Biodiversidad y Desarrollo Sustentable UNACH-159 por el acompañamiento a salidas a campo.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Alatorre, R. R. (2009). XXXI Congreso Nacional de Control Biológico, Villahermosa. Tabasco. Manual de control de calidad de microorganismos patógenos.
- Baruch, Z. M. J. (2012). Prevalencia de ranchos y factores asociados con poblaciones de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* resistentes a cipermetrina en municipios de la zona centro del estado de Veracruz. Veracruz. Pag.10.
- Bautista-Gálvez, A., Barrera, J.F., Payró de la Cruz, E., Salgado-García, S., Gómez-Ruiz, J., Gómez-Leyva, J.F. (2012). Genetic characterization of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) sorokin isolates from sugarcane field and their pathogenicity against *Aeneolamia postica* (Walker) (Hemiptera: Cercopidae). Universidad y Ciencia (28) (3):217-229. ISSN:0186-2979.
- Bautista, G.A. Pimentel S.R. y Gómez V.A. (2017). Control ciológico de la garrapata *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* con hongos entomopatógenos. Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Vol. 6. Num. 12. Pag 1-29. ISSN: 2007-9990. <https://doi.org/10.23913/ciba.v6i12.68>
- Bazán, T. M. (2002). Efecto de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) en el control biológico de *Boophilus microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae) en ganado bovino estabulado. Tecomán, Colima. Pag. 9.
- Elósegui, O., Nieves, C., Díaz, R., Bel, P.N., Carr, A. (2003). Comportamiento del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) vuill. Cepa Lbb-1 en Agar Sabouraud Dextrosa producido en Cuba. Fitosanidad, Instituto de Investigación de Sanidad Vegetal. Cuba. Vol. 7(2). Pag. 49-53
- García - Gutiérrez, C., Hernández - Velázquez, V. M., González - Maldonado, M. B. (2006). Hongos entomopatógeno. Biotecnología Financiera Aplicada a Bioplaguicidas. México D. F. pág. 100.
- Goetell, S.M., Inglis, D.G. (1997). Fungi: Hyphomycetes. Manual of Techniques in Insect Pathology. Edic by: Lacey. A. L. Yakima Agricultural Research Laboratory. USDA. Pag. 213-244. <https://doi.org/10.1016/B978-012432555-5/50013-0>
- Lew-Tabor, A. E., Bruyeres, A. G., Zhang, B., Rodríguez, M. V. (2014). *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* tick in vitro feeding methods for functional (dsRNA) and vaccine candidate (antibody) screening. Ticks and Tick-borne Diseases. 5(5): 500-510. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.03.005>
- Melo, D.R., Reis, R.C.S., Bittencourt, V.R.E.P. (2006). Patogenicidade In vitro do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o garrapata *Boophilus microplus* (canastrini, 1887). Rev. Brass. Parasitol. Vet., 15, 4, 157-162.
- Monroy, R., Lozano, E., Pimentel, R., Brindis, A., Hernández, F., Coutiño, R. (2016). Análisis Económico - Financiero de un Acopio Lechero en la Región Maya de Chiapas. KUXULKAB'- Tierra viva o naturaleza en voz Chontal-, 22(43), 45-54.
- Ojeda-Chi, M. M., Rodríguez-Vivas, R. I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., & 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.
- Ruiz-Sánchez, E., Chan-Cupul, W., Pérez, G.A., Cristóbal-Alejo, J., Uch-Vázquez, B., Tun-Suárez, J. M., Munguía-Rosales, R. (2011). Crecimiento, esporulación y germinación in vitro de cinco cepas de *Metarhizium* y su virulencia en huevos y ninfas de *Bemisia tabaci* II Revista Mexicana de Micología (33): 9-15.