

Metarhizium anisopliae como mico-acaricida para el control de la garrapata *Rhipicephalus microplus*

Ana L. Valverde-Sánchez¹, Xiomara Mata-Granados¹, Roberto Lezama-Gutiérrez², Marlen Camacho-Calvo¹
Escuela de Agronomía¹, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias²
Instituto Tecnológico de Costa Rica¹, Universidad de Colima²
Florencia, Ala., Costa Rica¹; Tecmán, Col., México²
analissette@live.com, [xmata, mcamacho]@itcr.ac.cr, rlezama@ucol.mx

Abstract— The objective of this review was to describe scientific advances focused on the biological control of the tick *Rhipicephalus microplus* using the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *R. microplus* represents a serious threat to the livestock industry, to be the etiologic agent of devastating diseases that affect human health and animal welfare. Efforts to control the arthropod have focused primarily on the implementation of chemical miticides, irrational use has caused resistance in some populations of ticks to most chemicals on the market, these miticides cause a major ecological impact and could affect traces humans through animal products; however, in recent years it has been implemented as a promising biological control and effective tool against ticks.

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

Resumen— El objetivo de esta revisión fue describir avances científicos enfocados en el control biológico de la garrapata *Rhipicephalus microplus* mediante la utilización del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. *R. microplus* representa una grave amenaza en la industria ganadera, al ser agente etiológico de enfermedades devastadoras que afectan la salud humana y el bienestar animal. Los esfuerzos para controlar este artrópodo se han centrado principalmente en la implementación de acaricidas químicos, su uso irracional ha provocado resistencia en algunas poblaciones de garrapatas a la mayoría de productos químicos en el mercado, estos acaricidas causan un importante impacto ecológico y podrían afectar a los humanos a través de trazas en productos de origen animal; sin embargo, en los últimos años se ha implementado el control biológico como herramienta promisoriosa y eficaz contra la garrapata.

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

I. INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) (Murrel y Barker, 2003) es conocida comúnmente como la garrapata del ganado (Fernandes et al., 2006). Según Duarte et al. (2008), Martínez-Velazquez et al. (2011), Marufu et al. (2014) y Monteiro et al. (2014) es uno de los principales obstáculos en la producción ganadera en regiones tropicales y subtropicales, se estima que ésta es la responsable de pérdidas económicas anuales que rondan los \$US 2.5 billones alrededor del mundo (Lew-Tabor et al., 2014). Villarino et al. (2002), Rosario-Cruz et al. (2009), Kumar et al. (2012) y Reck et al. (2014) indican que este artrópodo afecta al ganado en áreas de América Central y del Sur, al transmitir patógenos, limitar y reducir la producción animal, así como altos costos económicos en su control químico. Ostfeld et al. (2006) y Fernandes et al. (2012) mencionan que este ácaro representa una grave amenaza tanto para la salud humana como la de animales domésticos y salvajes; por su parte, Kumsa et al. (2015) citan que alrededor del 10 % de las especies de garrapatas hasta ahora identificadas son responsables de transmitir patógenos a seres humanos y a los animales.

De acuerdo con Angelo et al. (2010) y Reck et al. (2014) el principal método para el control de garrapatas ha radicado en el uso de acaricidas químicos; sin embargo, la utilización de productos de síntesis química además de contaminar al medio ambiente, podrían causar toxicidad en animales e inducir resistencia química o tolerancia en algunas poblaciones de garrapatas (Villarino et al., 2002; Fernandes et al., 2012).

Tal como lo mencionan Angelo et al. (2010) y Sun et al. (2011) en los últimos años se ha investigado el control biológico como un método alternativo para el control de garrapatas. Lubeck et al. (2008), Téllez-Jurado et al. (2009) y Fernandes et al. (2011) reportan que el empleo de hongos entomopatógenos como biocontroladores, representa una estrategia de control que ha ido incrementándose recientemente, ya que son una medida eficaz contra plagas ante la incorrecta e irracional utilización de métodos convencionales como lo son la utilización de productos químicos. Aunado a lo anterior, se han reportado numerosos estudios realizados *in vitro* e *in vivo* en donde se evidencia el uso de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) como una alternativa prometedor a la utilización de acaricidas químicos para el control de *R. microplus* (Frazzon et al., 2000; Quinelato et al., 2012), además otros autores indican el efecto bioacaricida de este hongo en otras especies de garrapatas de importancia económica (Benjamin et al., 2002; Hornbostel et al. 2004; Kirkland et al., 2004; Hornbostel et al., 2005; Pourseyed et al., 2010; Kaaya et al., 2011).

Al respecto, Ribeiro et al. (2008) destacan la importancia de búsquedas de manejo alternativo y/o complementario para el control de poblaciones de garrapatas, además que la aplicación de esta estrategia para el control de plagas durante un período prolongado, puede llegar a ser uno de los métodos más eficientes, económicos y con mayor selectividad a implementar.

El propósito de la presente revisión es presentar información actualizada sobre el uso de *M. anisopliae* en el control de *R. microplus*.

II. GENERALIDADES DE LAS GARRAPATAS

De acuerdo a publicaciones de Antunes et al. (2015) y Kumsa et al. (2015) las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados, reservorio de una amplia diversidad de agentes patógenos de seres humanos y animales alrededor del mundo. A su vez, Velayutham et al. (2012) indican que se han descrito alrededor de 825 especies.

Las garrapatas pertenecen al Phylum Artropoda, así como a la clase Arachnida y subclase Acari (Rodríguez-Vivas et al., 2013; Alemán et al., 2014). Holdsworth et al. (2006) y Brahma et al. (2014) informan que estos ectoparásitos se encuentran en el Suborden Ixodida, mismo que se compone de tres familias, Nuttalliellidae en la cual solo se ha identificado una única especie *Namaqua nutalliella* Bedford, la Argasidae conocidas comúnmente como garrapatas blandas y la Ixodidae como garrapatas duras. Esta última familia, se caracteriza por ser la más amplia, al respecto Guglielmone et al. (2010) mencionan que está conformada por 702 especies de garrapatas distribuidas en 14 géneros, Holdsworth et al. (2006) y Brahma et al. (2014) mencionan que alberga alrededor del 80 % de las garrapatas de importancia veterinaria, de acuerdo a Guglielmone et al. (2010) dentro de esta familia se encuentra la garrapata *R. microplus*.

A. Distribución geográfica, ecología y condiciones ambientales de *R. microplus*

Según lo reportado por Chagas et al. (2014) y De Clercq et al. (2015) *R. microplus* es una de las especies de garrapatas más ampliamente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales del mundo, los ixódidos requieren de diversas condiciones climáticas para la proliferación o desarrollo de sus poblaciones, Cordero y Salas (2000) citan que éstas demandan de un clima óptimo con temperaturas que oscilen entre los 26 °C y 27 °C, una humedad relativa de 80 % y una vegetación abundante.

Álvarez et al. (2007) indican que en Costa Rica preexisten las condiciones ambientales adecuadas para la proliferación de las garrapatas; no obstante, el comportamiento poblacional de esta plaga varía de acuerdo a la zona ecológica en el país, estos mismos autores mencionan que debido a las condiciones climáticas imperantes en el territorio costarricense se podría tener la presencia de 4.5 generaciones de *R. microplus* anualmente. En contraste, Shyma et al. (2014) comentan que las condiciones ambientales

fluctuantes por el calentamiento global, podrían desencadenar cambios en la epidemiología de las infestaciones de los ixódidos.

B. *Biología de la garrapata R. microplus*

Reis-Menini et al. (2008) y Brahma et al. (2014) indican que *R. microplus* es una garrapata con preferencia por el ganado, al respecto, Rodríguez-Vivas et al. (2013) recalcan que esta garrapata completa su fase parasitaria de su ciclo de vida en sólo un hospedero. Flores-Fernández et al. (2014) mencionan que el ciclo de vida de este ectoparásito se ha subdividido en dos etapas, las cuales corresponden a la etapa no parásita o de vida libre que es completamente independiente del hospedero, en donde las masas de huevos eclosionan en el medio ambiente, posteriormente las larvas emergen del huevo y suben a la vegetación en búsqueda de un hospedero, mientras que en la etapa parásita, las larvas se adhieren al hospedero, además se da el cambio evolutivo a ninfa y adultos sexualmente dimórficos. Aunado a lo anterior, el ciclo de vida de *R. microplus* se puede completar en un período de 3 a 4 semanas si las condiciones imperantes son favorables (Flores-Fernández et al. 2014). Asimismo, Barrero et al. (2011) destacan la capacidad que tiene la garrapata *R. microplus* para sobrevivir sin alimentarse durante un período de 3 a 4 meses en época de verano y 6 meses máximo en temperaturas frías.

C. *Principales daños causados por las garrapatas*

Según lo reportado por Ghosh et al. (2005) las garrapatas ocasionan efectos directos e indirectos en los animales, afectando la producción ganadera. Entre los daños directos, Holdsworth et al. (2006), Duarte et al. (2008), Olds et al. (2013) y Rodríguez-Vivas et al. (2013) indican que la picadura causada por la garrapata en el animal ocasiona pérdida de sangre y podría propiciar una infección secundaria, también establecen que estos parásitos externos pueden provocar condiciones tóxicas en los animales como parálisis y toxicosis. Según lo reportado por Kaufman (2010) las garrapatas son conocidas como vectores de una amplia gama de agentes patógenos; del mismo modo, Ren et al. (2012) y Antunes et al. (2015) indican que *R. microplus* es una de las garrapatas de mayor relevancia por ser considerada vector de enfermedades en animales, específicamente transmite babesiosis (*Babesia bigemina* y *Babesia bovis*) y anaplasmosis (*Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) en bovinos. Por su parte, Rajput et al. (2006), Brahma et al. (2014) y Galay et al. (2015) mencionan que las garrapatas juegan un papel importante como vectores de distintos virus, helmintos, bacterias y protozoos. Por otra parte, Rajput et al. (2006) mencionan que las garrapatas al encontrarse sobre la piel y el tejido subcutáneo del huésped originan graves daños sobre los cueros, repercutiendo en la disminución de la calidad de los mismos.

Entre los efectos indirectos Jonsson et al. (2001), de Melo et al. (2006), Holdsworth et al. (2006), Reis-Menini et al. (2008), Martínez-Velazquez et al. (2011), Zeringóta et al. (2013), Brahma et al. (2014) y da Silva et al. (2014) señalan que la garrapata *R. microplus* al alimentarse de la sangre del animal provoca inapetencia, baja conversión alimenticia, disminución en la ganancia de peso de los animales, mortalidad, problemas de fertilidad en el hato, anemia y reducción en la producción de carne y leche. Del mismo modo, Arguedas et al. (2008) y Ojeda-Chi et al. (2011) reportan que las infestaciones por ixódidos en bovinos generan cuantiosas pérdidas financieras en la producción de carne, leche y cueros.

III. CONTROL DE *R. MICROPLUS* CON EL HONGO ENTOMOPATÓGENO *M. ANISOPLIAE*

Tal como lo mencionan Reis-Menini et al. (2008) el uso de agentes biológicos resulta una práctica prometedora ante los problemas causados por el uso de acaricidas químicos. Schumacher y Poehling (2012) indican que los hongos entomopatógenos forman un grupo de controladores biológicos muy amplio, al utilizarse contra gran cantidad de plagas insectiles y de arácnidos. Al respecto, Fernandes et

al. (2012) afirman que los hongos entomopatógenos han demostrado tener la capacidad de producir una elevada mortalidad en todas las fases evolutivas de varias especies de garrapatas y causar una disminución en la oviposición, lo anterior concuerda con Fernandes et al. (2006) y Ortiz-Urquiza et al. (2015) quienes enuncian que *M. anisopliae*, es uno de los hongos entomopatógenos de mayor importancia utilizados a nivel mundial.

J. Generalidades de *M. anisopliae*

M. anisopliae es conocido comúnmente como Muscardina verde, ya que es el agente causal de dicha enfermedad (Roberts y St Leger, 2004). Ortiz-Urquiza et al. (2015) destacan que este hongo además de ser cosmopolita, se encuentra ampliamente distribuido en la mayoría de ecosistemas como saprófito. De acuerdo con lo publicado por Dutra et al. (2004), Beys da Silva et al. (2010ab), Santi et al. (2010b), Schrank y Vainstein (2010) y Behle et al. (2013) *M. anisopliae* ha sido muy investigado en el control biológico de artrópodos, especialmente en garrapatas y se encuentra bien caracterizado para el control de la garrapata *R. microplus*.

K. Investigaciones realizadas con *M. anisopliae* para el control de *R. microplus*

Se han reportado numerosas investigaciones efectuadas en condiciones de laboratorio, mismas que demuestran el potencial patogénico de *M. anisopliae* para el control de *R. microplus*. En México Ojeda-Chi et al. (2010) reportan que las cepas Ma34 y Ma14 de *M. anisopliae*, presentaron mayor efectividad en el control de larvas y adultos de la garrapata *R. microplus*, específicamente con la mezcla de ambas cepas obtuvieron una eficacia del 100 % a los 14 días post-tratamiento a la concentración del hongo de 1×10^8 conidios/mL en el control de hembras ingurgitadas (alimentadas con sangre) y del 90 % en el control de larvas a los 20 días del tratamiento. Estudios similares realizados por Lubeck et al. (2008) evidencian que *M. anisopliae* a la concentración de 10^8 conidios/mL, causa una mortalidad entre 90 a 100 % al cuarto día de infección en hembras adultas de *R. microplus*.

En Australia Leemon et al. (2008) al evaluar *in vitro* la patogenicidad de *M. anisopliae* a la concentración de aproximadamente 2×10^8 conidios/mL más 10 % de aceite sobre hembras no ingurgitadas de *R. microplus*, hallaron alta mortalidad de las garrapatas (100 %), así como una disminución en la producción de huevos de hembras ingurgitadas recolectas a los 3 días de efectuada la aplicación, después de la pulverización del hongo sobre los bovinos. Esto coincide con resultados obtenidos por Frazzon et al. (2000) quienes utilizaron la cepa E6S1 de *M. anisopliae*, a una concentración de 10^7 conidios/mL, siendo patogénica contra hembras ingurgitadas de *R. microplus*, al provocar una mortalidad del 100 %, pero esta mortalidad se alcanzó hasta 14 días después del tratamiento. Por su parte en Brasil, Onofre et al. (2001) y de Melo et al. (2006) mediante ensayos *in vitro*, sumergiendo hembras de *R. microplus* en suspensiones acuosas de conidios de *M. anisopliae*, detectaron una disminución en el porcentaje de eclosión de los huevos tratados con el hongo. De la misma manera en China, Ren et al. (2012) determinaron la acción patogénica de *M. anisopliae* (M.aAT04) al disminuir el índice de eficiencia reproductiva de *R. microplus* y al causar una mortalidad del 100 % en hembras ingurgitadas a la concentración de 10^8 y 10^9 conidios/mL, 15 días después de aplicado el tratamiento.

En la formulación de micoacaricidas para el control de *R. microplus*, Camargo et al. (2014) señalan que la utilización de aceites en suspensiones de conidios ayuda a la protección del hongo contra condiciones ambientales adversas, así como inducir una mejor adhesión de la estructura fúngica en la superficie del artrópodo. En este contexto, estudios *in vitro* de Camargo et al. (2012) reportan el uso del formulado *M. anisopliae* (Ma 959) a base de aceite mineral como producto eficaz contra garrapata, debido a que esta formulación obtuvo los mejores resultados en el control de huevos, larvas y hembras ingurgitadas de *R. microplus* en comparación con formulaciones del hongo a base de agua, concluyendo que, el aceite mejora la eficacia del hongo. Al respecto Leemon y Jonsson (2008) al aplicar *in vitro*

suspensiones de conidios de *M. anisopliae* (3×10^8 conidios/mL) formuladas en aceite y en agua contra hembras repletas (*R. microplus*), concluyeron que la formulación en aceite alcanza una mortalidad del 100 % a las 43 horas de la aplicación, no así la suspensión de conidios en formulación acuosa, que logra hasta las 120 horas el 100 % de la mortalidad en las garrapatas.

Investigaciones similares en condiciones de laboratorio de Quinelato et al. (2012) en Brasil, indican la acción patogénica de 30 aislados brasileños de *M. anisopliae*, sobre larvas de *R. microplus*, al obtenerse altos niveles de mortalidad al lograr un LC50 a 10^6 conidios mL⁻¹, en términos generales, este efecto es proporcional a la concentración de conidios utilizado, además no encontraron diferencias entre el origen de las cepas y su virulencia. Según Perinotto et al. (2012) el uso de *M. anisopliae* (Ma 959) contra larvas sin alimentarse de *R. microplus*, presentó los mejores resultados en el control de este ectoparásito al compararse con un aislado de *B. bassiana* (Bb 986).

En Colombia López et al. (2009) reportan, el uso de la cepa 137bm de *M. anisopliae* como agente de control biológico contra *R. microplus*, al reducir *in vitro* la capacidad reproductiva de la garrapata afectando la oviposición entre un 90 a 96 % a la concentración del hongo de 1×10^8 y 1×10^9 conidios/mL y al afectar la viabilidad de los huevos en más de un 98 %. Además, estos mismos autores destacan la eficacia de la cepa 137bm al disminuir en campo en un 75 % las infestaciones de garrapatas en ganado del cruce Holstein x Cebú, al rociar sobre los animales suspensiones de conidios a una concentración de 1×10^8 conidios mL⁻¹, así como una disminución del 87 % de la población de este ectoparásito en fase larvaria después de la primera semana de aplicado el hongo (5×10^{12} conidios/ha) en la pastura.

En Costa Rica Arguedas et al. (2008) exponen resultados prometedores para el control de esta garrapata, al obtener *in vitro* un aumento en la mortalidad y en la eficacia del hongo contra larvas, la cual es directamente proporcional a la concentración de *M. anisopliae* utilizada, la mortalidad obtenida fue de 70.70, 96.03 y 98.64 % a la concentración de 10^8 , 10^9 y 10^{10} conidios/mL, respectivamente. A estas mismas concentraciones la eficacia alcanzada fue de 67.75, 93.67 y 96.34 %, además evidenciaron un aumento en la inhibición de la oviposición, el mejor resultado se observó en las concentraciones de 10^9 y 10^{10} conidios/mL con un porcentaje de 72.70 y 77.29 de inhibición. Además, Barrantes-Herrera (2013) evaluó en condiciones controladas tres aislados de *M. anisopliae* y un aislado de *B. bassiana* contra hembras ingurgitadas de *R. microplus*, los resultados demostraron que *M. anisopliae* fue el que obtuvo mejores resultados de control, en especial con el aislado LaBioMt_{slo.tal} (Laboratorio de Biocontroladores, *M. anisopliae*, hongo aislado de suelo proveniente de Talamanca, Costa Rica) de *M. anisopliae*, con el cual se obtuvo una mortalidad acumulada de 97.89 % y una eficacia de 97.89 % contra este artrópodo a los 8 días de aplicado el tratamiento, este aislado también ha sido estudiado previamente a nivel *in vitro* por Herrera-Barrantes et al. (2010), quienes a la concentración de 10^9 conidios/mL el hongo presentó valores de mortalidad del 100 % a los 5 días de aplicado el tratamiento, estos autores a nivel de campo al aplicar este aislado a la misma concentración sobre bovinos infestados con garrapatas hembras adultas de *R. microplus*, obtuvieron una mortalidad de 85 % a los 30 días después de la aplicación del hongo y en condiciones. También, el aislado LaBioMt_{slo.tal} de *M. anisopliae* ha sido evaluado en condiciones de invernadero sobre la pastura *Brachiaria brizantha* cv. Marandú infestada con larvas de *R. microplus*, se demostró la efectividad de la aplicación de este hongo con la aspersión de conidios suspendidos en agua a la concentración de 10^8 conidios/mL, al obtener una eficacia de 97.50 % a los 14 días de la aplicación del hongo (Valverde-Sánchez et al., 2015).

Sin embargo, existen en menor cantidad trabajos realizados bajo condiciones naturales alrededor del mundo, donde se demuestra las variaciones en la efectividad de los hongos entomopatógenos para el control de poblaciones de garrapatas tanto en aplicaciones tópicas como en pastos. En México, Ángel-Sahagún et al. (2010) realizaron un estudio en campo con larvas de *R. microplus* en vegetación (*Cynodon plectostachyus* (L.)), evaluando varias formulaciones de la cepa Ma 14 de *M. anisopliae* en

Tween, celite, salvado de trigo y citrolina a una concentración del hongo de 2×10^9 CFU/m², encontrándose los mejores valores con la formulación de conidios con celite y con salvado de trigo a los 14 días después de aplicados los tratamientos, con una disminución en el número de garrapatas de 67.8 y 94.2 %, respectivamente.

Ojeda-Chi et al. (2010) evaluaron la mezcla de dos cepas de *M. anisopliae* (Ma34 + Ma14) con una concentración de 1×10^8 conidios/mL en etapas no parasitarias de la garrapata, obteniendo una eficacia de un 67.7 y 100 % en estación húmeda y seca, respectivamente a los 35 días post-tratamientos. En contraste, estudios realizados por Garcia et al. (2011) al aplicar suspensiones acuosas conidiales de *M. anisopliae* (E9) sobre *Brachiaria decumbens* infestada con larvas de *R. microplus*, no encontraron diferencias en la aplicación del hongo en comparación con el control, después de realizadas 12 pulverizaciones con *M. anisopliae* (E9) ($\approx 10^7$ conidios/mL).

El aislado E9 de *M. anisopliae* (1.8×10^8 conidios mL⁻¹) fue rociado sobre las pasturas *Brachiaria brizantha* y *Cynodon* spp. infestadas con hembras ingurgitadas de *R. microplus* en Brasil. De acuerdo a Basso et al. (2005), los resultados revelaron una reducción en el número de larvas de garrapatas, la eficacia del hongo fue de 87 a 94 % durante los 35 y 48 días después de la infestación; sin embargo, el mejor control fue reportado para el pasto *Cynodon* spp. al presentar los valores más bajos de infestación de esta garrapata.

Otro estudio realizado en México sobre bovinos infestados de manera natural con hembras adultas de *R. microplus*, demostró que aplicaciones acuosas reiteradas de *M. anisopliae* (cepa Ma34) cada 15 días a una concentración de 1×10^8 conidios/mL, disminuye la infestación de garrapatas desde la segunda aplicación del hongo, con una efectividad que va desde 40.0 a 91.2 % (Alonso-Díaz et al., 2007). De igual manera, Rodríguez-Alcocer et al. (2014) encontraron que mediante aplicaciones acuosas repetitivas utilizando dos cepas de *M. anisopliae* en mezcla (Ma14 + Ma34) a la concentración 1×10^8 conidios/mL sobre bovinos, se reduce la población de *R. microplus* desde la primera aplicación fúngica, controlando la garrapata en su estado larvario, ninfal y adulto. Otro ensayo en bovinos rociados con *M. anisopliae* cepa Ma379 (1×10^8 conidios mL⁻¹), Romo-Martínez et al. (2013) demostraron la eficacia del hongo sobre *R. microplus* al disminuir la cantidad de larvas, ninfas y adultas de esta garrapata, desde los 7 a 21 días de la inoculación fúngica, además de afectar índices reproductivos al reducir la cantidad de huevos, el peso de hembras ingurgitadas e inhibir la oviposición (79 %); no obstante, también informan que el porcentaje de control con el hongo fue de 98 a 99 %, siendo muy parecido al obtenido con el acaricida químico amitraz. De igual manera en Trinidad y Tobago, Polar et al. (2005a) describen la utilización de las cepas ARSEF327 y IMI386697 (10^8 conidios/mL) de *M. anisopliae* en campo para el control de la garrapata *R. microplus* sobre ganado bovino; sin embargo, los mejores resultados fueron encontrados con la cepa IMI386697 (8.5 ± 0.64 garrapatas por animal), tres semanas después de la dispersión sobre los animales.

Estudios recientes han evaluado la aplicabilidad de la combinación de *M. anisopliae* con acaricidas químicos, Webster et al. (2015) realizaron aplicaciones de conidios de *M. anisopliae*, solución acaricida de cipermetrina más clorpirifos, y la mezcla del hongo con la solución acaricida, a la concentración del hongo de 10^8 conidios/mL sobre ganado infestado con hembras repletas de *R. microplus*, los resultados revelaron una eficacia media de 56.3, 71.1 y 97.9 %, respectivamente; siendo el grupo tratado sólo con el hongo y sólo con la mezcla acaricida iguales estadísticamente. Por su parte, en condiciones de laboratorio, Bahiense et al. (2006) reportan la compatibilidad de *M. anisopliae* en mezcla con deltametrina para el control de poblaciones de *R. microplus* resistentes al piretroide sintético, concluyendo que la asociación del producto biológico con el químico causa una mayor mortalidad de las larvas. Publicaciones recientes por Monteiro et al. (2013) destacan la asociación *in vitro* del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterohabditidae) cepa HP88 con el

hongo *M. anisopliae* (IBCB 116) para el control de *R. microplus*, al obtenerse un porcentaje de control del 100 %.

M. anisopliae ha sido formulado en suspensiones acuosas, en aceite, aceite/acuosa (50:50), formulaciones granulares y en conidios almacenados en polvo seco (Ekesi et al., 2005; Zhang y Hunter 2005). Behle y Jackson (2014) reportan que mediante técnicas recientes de fermentación en líquido utilizando *M. anisopliae* se da la formación de microesclerocios, estructuras que tiene la capacidad de sobrevivir a la desecación, por lo que son utilizadas en formulaciones de gránulos secos. En otro estudio Camargo et al. (2014) realizaron aplicaciones de *M. anisopliae* (1×10^8 conidios/mL) junto con 10 % de aceite mineral sobre bovinos, encontrando un mayor control sobre poblaciones de *R. microplus* al reducirse el número de garrapatas en los animales tratados, la eficacia fue de 67.39 % tres semanas después de aplicados los tratamientos, además encontraron que la aplicación del hongo en mezcla con el aceite disminuye la eclosión porcentual y el índice de producción de huevos. Polar et al. (2005b) evaluaron formulaciones de *M. anisopliae*, en base de aceite parafínico, aceite de palma y aceites emulsionables adyuvantes, a una concentración del hongo de 1×10^8 conidios mL⁻¹ contra hembras ingurgitadas de *R. microplus*, los resultados indicaron que la efectividad de *M. anisopliae* podría optimizarse con la utilización de agentes a base de aceite. Arguedas et al. (2008) estos investigadores en Costa Rica también reportan el control de poblaciones de *R. microplus* al asperjar conidios de *M. anisopliae* (10^{10} conidios mL⁻¹) sobre el ganado en condiciones de campo, al presentar una disminución de 79 % de garrapatas adultas en una finca tratada con el hongo y de 59 % en otra finca tratada con el acaricida químico amitraz, como tratamiento control.

IV. CICLO DE INFECCIÓN DE *M. ANISOPLIAE* SOBRE *R. MICROPLUS*

Lecuona (1996), Bittencourt et al. (1999), Arruda et al. (2005) y Schrank y Vainstein (2010) describen el proceso de infección de *M. anisopliae*, el cual consiste en la adhesión de los conidios a la cutícula del huésped a través de interacciones hidrofóbicas y material delgado mucilaginoso, germinación de los conidios en la cutícula, diferenciación del tubo germinativo en apresorio, penetración a través de la cutícula al hemocele, colonización o multiplicación del hongo dentro del hospedero, liberación de toxinas, muerte del artrópodo, extrusión del cadáver del hospedero a la superficie, y la esporulación mediante formación de conidióforos y posteriormente la dispersión de los conidios.

Arruda et al. (2005) indican que, el proceso de adhesión y germinación de los conidios de *M. anisopliae* sobre *R. microplus* transcurre entre las 24 y 48 horas, posteriormente se da la formación de los apresorios, éstos penetran la cutícula, al ejercer presión mecánica sobre la misma y desencadenar secreciones enzimáticas hidrolíticas que conducen a la penetración, posterior a este proceso se da la colonización masiva en la cavidad del artrópodo, de acuerdo a Arruda et al. (2005), este inicia 72 horas después de la inoculación, estos mismos autores mencionan que, 96 horas después de la inoculación, se da el crecimiento de micelio sobre la cutícula para la formación de nuevos conidios.

Según lo descrito por Beys da Silva et al. (2010ab) durante el proceso infectivo *M. anisopliae* emplea una estrategia sinérgica en las secreciones de enzimas hidrolíticas y lipolíticas como lipasas, proteasas, quitinasas, y esterases, además ejerce una presión mecánica sobre el tegumento para traspasar la cutícula del huésped y así romper la primera barrera (la cutícula) que éste posee como defensa para evitar la infección del hospedero; lo anterior sugiere que determinados componentes del tegumento del artrópodo son quizás más fácilmente reconocidos por *M. anisopliae* e incitan niveles más elevados de la actividad lipolítica con lo cual pueden producir más micelio.

Investigaciones desarrolladas por Beys da Silva et al. (2010a) informan que las proteasas y quitinasas regulan la acción de las enzimas relacionadas con la infección efectuada por *M. anisopliae* sobre el hospedero. Por medio de su estudio, determinaron que los componentes de la cutícula de los artrópodos constituyen fuentes de carbono para *M. anisopliae* y obtuvieron que hay diferencias en la inducción de

la actividad lipolítica entre algunas de las fuentes de carbono ensayadas, también sugieren que este hongo secreta un conjunto importante de enzimas lipolíticas. Del mismo modo, Sapna et al. (2012) informan que antes y después de la penetración cuticular, las proteasas son de gran importancia en el abastecimiento de nutrientes; sin embargo, las quitinasas sólo participan durante el proceso de penetración fúngico.

Sin embargo, Schrank y Vainstein (2010) detallan que la producción de enzimas encargadas de interrumpir la integridad de los hospederos representa una fuerte ventaja para los patógenos, pero mencionan la importancia de realizar estudios referentes a la diversidad de estas enzimas y determinar cuál es la de mayor patogenicidad. También estos autores, encontraron que las enzimas que tienen la capacidad de degradar totalmente la quitina en monómeros N-acetilglucosamina se dividen en N-acetilglucosaminidasas [EC3.2.1.52, glucósido hidrolasas (GH) de la familia 20] y quitinasas (EC3.2.1.14, 18 y 19 de la familia GH). En relación al desarrollo del hongo dentro del hospedero Pucheta-Díaz et al. (2006) indican que el hongo invade el hemocele a través de cuerpos hifales y se disemina por tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias, retículo endoplásmico y membrana nuclear y hemocitos, hasta ocasionar la muerte del artrópodo.

Charnley (2003) y Franco et al. (2011) destacan que los hongos entomopatógenos además de producir sustancias tóxicas, también tienen la capacidad de producir metabolitos, péptidos cíclicos complejos y enzimas hidrolíticas y proteolíticas. Aunado a lo anterior, Fernandes et al. (2012) indican que la producción de toxinas por *M. anisopliae* difieren entre los aislados fúngicos, además, reportan que las destruxinas son los metabolitos tóxicos secundarios más conocidos producidos por hongos entomopatógenos. En relación a las toxinas, Schrank y Vainstein (2010) añaden que los mecanismos de reconocimiento del hospedero susceptible aún no se ha dilucidado, pero observaron que cuando *M. anisopliae* se cultiva *in vitro* había una mayor cantidad de proteínas expresadas diferencialmente en las cutículas de varios artrópodos, tales como *R. microplus*.

V. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL ESTABLECIMIENTO Y PATOGENICIDAD DE *M. ANISOPLIAE*

La patogenicidad fúngica de *M. anisopliae* varía en diferentes insectos (Ginsberg et al., 2002). Los diferentes niveles de susceptibilidad de *M. anisopliae* en diversas especies, etapas del desarrollo y poblaciones de garrapatas podrían afectar la eficacia del hongo como biocontrolador, además de factores genéticos y fisiológicos propios de los hongos, ha sido reportado por Gindin et al. (2002) y Perinotto et al. (2012).

Mediante un bioensayo realizado por Leemon y Jonsson (2012) con *R. microplus* en ganado ovino evaluando varios métodos de inoculación, obtuvieron que la virulencia de las cepas de *M. anisopliae* sobre las garrapatas varíe de acuerdo a los mecanismos que éstas posean para defenderse del ataque ejecutado por el hongo. La primera barrera de defensa que poseen las garrapatas contra los ataques fúngicos y el lugar donde primeramente se da la interacción patógeno-hospedero es la cutícula (Jarrold et al., 2007; Ment et al., 2010), esta barrera cuticular se compone principalmente de proteínas y quitina (Pedrini et al., 2007; Qazi y Khachatourians, 2007). Del mismo modo, Santi et al. (2010a) establecen que la cutícula además de ser el sitio donde inicia la infección micótica, es donde se necesita gran cantidad de enzimas para desencadenar el reconocimiento de recepción e iniciar el proceso de infección del hongo en el hospedero. Pedrini et al. (2007) señalan que las enzimas y toxinas secretadas por los hongos disminuyen la actividad de defensa del hospedero. Por otra parte, es primordial considerar las condiciones del almacenamiento de los hongos entomopatógenos, con el fin de impedir la pérdida de patogenicidad o la reducción de la virulencia de las cepas fúngicas (Lecuona, 1996).

En congruencia, Santi et al. (2010b) demuestran que la patogenicidad de *M. anisopliae* sobre la cutícula de *R. microplus* depende de la secreción de enzimas hidrolíticas que degradan la cutícula del hospedero y de la presión mecánica ejercida por el apresorio del hongo. Aunado a lo anterior, Gołębowski et al. (2008) reportan que en muchos artrópodos los lípidos epicuticulares residen en gran cantidad de compuestos alifáticos polares y no polares, los cuales podrían alterar la germinación de conidios de los hongos entomopatógenos. Se ha reportado que el hongo entomopatógeno *M. anisopliae* secreta enzimas como proteasas, quitinasas, lipasas y estererasas encargadas de la degradación de la cutícula de los artrópodos (Santi et al., 2010a; Sandhu et al., 2012; Sapna et al., 2012). En consecuencia, Sapna et al. (2012) demostraron que la virulencia de aislados de *M. anisopliae* es proporcional al incremento de la cantidad de enzimas producidas por el hongo.

Cabe destacar que Wang y St. Leger (2006) y Schrank y Vainstein (2010) reportan que cuando *Metarhizium* no puede traspasar la cutícula del huésped, podría infectarlo al superar la respuesta de inmunidad innata de éste, mediante la fabricación de sustancias inmunomoduladoras que suprimen el sistema de defensa del artrópodo, como la proteína parecida al colágeno MCL1 que evade el sistema de inmunidad del artrópodo. En relación, Castrillo et al. (2005) indican que la infección fúngica se da al desencadenarse un reconocimiento de sustancias compatibles entre el hongo y el hospedero, lo que permitiría la geminación del conidio y la penetración a través de la cutícula, además de darse la colonización del hongo en el hemocele.

Mediante estudios experimentales por Fang et al. (2010) identificaron una proteína llamada lacasa (MLAC1) en *M. anisopliae*, la cual está relacionada con la pigmentación conidial, la tolerancia al estrés abiótico y la patogenicidad. Por su parte, Fogaça et al. (2006) mencionan que la garrapata *R. microplus* en su respuesta inmune tiene péptidos antimicrobianos, los cuales son utilizados para eliminar de manera rápida la invasión de microorganismos.

Polar et al. (2008) sugieren que la disponibilidad de agua en la garrapata debe de ser considerado para la germinación de los conidios, ya que a través de los túbulos de Malpighi es secretada poca cantidad de orina y el exceso de líquido se elimina por salivación, lo que podría limitar la disponibilidad adecuada de humedad para la germinación del conidio; sin embargo, también indican que la piel y el cabello del animal (ganado) son fuentes de retención de humedad más estables.

De acuerdo a lo publicado por Ment et al. (2010) los hospederos mamíferos de las garrapatas podrían ocasionar afectaciones de manera directa o indirecta sobre los hongos. Polar et al. (2008) mencionan que los conidios aplicados de manera tópica sobre la piel del ganado podrían enfrentarse a defensas inmunitarias innatas siendo afectados de manera diferente si contactaran la cutícula de la garrapata; además, en general el pH alcalino de la piel del ganado beneficia el rendimiento de la utilización de hongos entomopatógenos.

Las secreciones que se encuentran en la superficie de la piel del ganado se componen de ácidos grasos, iones, proteínas y otros compuestos, estas secreciones consisten en sebo, sudor y microflora, las cuales podrían afectar la acción del hongo cuando es aplicado sobre la superficie del ganado, de manera específica reportan que el sebo de la piel de los animales daña la germinación de los conidios (Polar et al., 2008). Ensayos experimentales de Polar et al. (2005a) determinaron la tolerancia a la temperatura de dos cepas de *M. anisopliae* sobre la superficie del ganado y evaluaron su patogenicidad sobre *R. microplus*, los resultados indicaron que la temperatura de la superficie del ganado fue mayor que la temperatura ambiental, la zona de la columna vertebral fue que presentó la mayor temperatura (34.7 ± 0.34 °C), en relación a la tolerancia térmica encontraron que al aumentar la temperatura en ambos aislados disminuyó el crecimiento radial, pero recalcan que el aislado IMI386697 siempre presentó mayor crecimiento fúngico que ARSEF3297, demostrándose la tolerancia de IMI386697 a temperaturas más altas (34 °C), además a 31 - 35 °C en simulación de la temperatura de la superficie del ganado, IMI386697 obtuvo mayor patogenicidad que el aislado ARSEF3297.

Del mismo modo lo comprueban los estudios de Kaaya et al. (2011) y Fernandes et al. (2012) estos autores citan que al realizar aplicaciones de hongos en el campo contra garrapatas se obtiene una menor eficacia comparado con los datos que se consiguen en condiciones controladas en laboratorio, lo anterior se atribuye a factores bióticos y climáticos desfavorables que se manifiestan negativamente contra los hongos entomopatógenos. Dantigny y Nanguy (2009) demostraron que factores como el origen, virulencia de la cepa y las condiciones ambientales en el campo influyen en la germinación de *M. anisopliae*, además una humedad relativa por debajo de 53 % reduce la viabilidad de los conidios. Del mismo modo, Miller et al. (2004), Kabaluk y Ericsson (2007), Meyling y Eilenberg (2007), Dantigny y Nanguy (2009) y Fernandes et al. (2012) mencionan que los factores ambientales son los responsables de afectar la sobrevivencia de *M. anisopliae*, al interferir en el crecimiento y producción del hongo, así como en la producción de micotoxinas, señalando entre los factores más importantes la temperatura, humedad, rayos ultravioleta A y B, comportamiento del agua, textura o composición del suelo y el pH. Otra investigación sugiere que cambios en la temperatura diurna son más importantes biológicamente que la temperatura de la superficie del ganado, ya que lugares como ubre anterior y posterior, costillas, área del cuello no se encuentran en exposición directa a la radiación solar (Polar et al., 2005a).

En relación a la radiación UV-B Braga et al. (2001a) en ensayos *in vitro*, indican que la exposición de *M. anisopliae* a este tipo de radiación durante una hora provocó una demora de varias horas en la germinación de los conidios sobrevivientes; por otra parte, aquellos conidios expuestos por mayor tiempo tuvieron un retraso en la germinación durante varios días, en síntesis Alves et al. (1998) y Braga et al. (2001b) demuestran que la exposición del hongo a la radiación solar UV ocasiona un retardo en la germinación conidial. Por último, Rangel et al. (2005) demostraron que aislados de *M. anisopliae* de latitudes más altas fueron los que presentaron mayor susceptibilidad al calor en comparación con los aislados fúngicos pertenecientes a sitios cercanos al ecuador.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo a los estudios referenciados, *M. anisopliae* representa una alternativa promisoriosa dentro de un manejo integrado para el control de la garrapata *R. microplus*. Es trascendental continuar con estudios donde no sólo se consideren aspectos propios de este entomopatógeno si no también factores que limitan su acción bajo condiciones naturales, esto con el objetivo de proponer formulaciones estables en el campo.

REFERENCIAS

- Alemán, G. Y., Martínez, M. S., Corona, G. B. (2014). Las garrapatas de interés veterinario en Cuba, y su importancia en las condiciones climáticas cambiantes. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 15(2), 1-22.
- Alonso-Díaz, M. A., García, L., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., Angel-Sahagún, C. A., Rodríguez-Vivas, R. I., 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.
- Álvarez, V., Hernández, V., Romero, J. J. (2007). Fase no parasítica de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) en condiciones ambientales y de laboratorio en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 31(2), 49-56.
- Alves, R. T., Bateman, R. P., Prior, C., Leather, S. R. (1998). Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. *Crop Protection*, 17, 675-679.
- Angelo, I. C., Fernandes, É. K. K., Bahiense, T. C., Perinotto, W. M. S., Moraes, A. P. R., Terra, A. L. M., Bittencourt, V. R. E. P. (2010). Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 172, 317-322.
- Ángel-Sahagún, C. A., Lezama-Gutiérrez, R., Molina-Ochoa, J., Pescador-Rubio, A., Skoda, S. R., Cruz-Vázquez, C., Lorenzoni, A. G., Galindo-Velasco, E., Fragoso-Sánchez, H., Foster, J. E. (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. *Veterinary Parasitology*, 170, 278-286.
- Antunes, S., Merino, O., Lérias, J., Domingues, N., Mosqueda, J., de la Fuente, J., 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.
- Arguedas, M., Álvarez, V., Bonilla, R. (2008). Eficacia del hongo entomopatógeno *Metharizium anisopliae* en el control de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Agronomía Costarricense*, 32(2), 137-147.
- Arruda, W., Lübeck, I., Schrank, A., Vainstein, M. H. (2005). Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 37, 231-244.
- Bahiense, T. C., Fernandes, É. K. K., 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.
- Barrantes-Herrera, L. G. (2013). Evaluación *in vitro* de la patogenicidad de hongos entomopatógenos del género *Metarhizium* sp. y *Beauveria* sp. para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) en bovinos de leche. Tesis Lic. Alajuela, CR: TEC. Esc. de Agronomía. 93 p.
- Barrero, R. A., Keeble-Gagnère, G., Zhang, B., Moolhuijzen, P., Ikeo, K., Tateno, Y., Gojobori, T., Guerrero, F. D., Lew-Tabor, A., Bellgard, M. (2011). Evolutionary conserved microRNAs are ubiquitously expressed compared to tick-specific miRNAs in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Genomics*, 12, 328.
- Basso, L. M. de S., Monteiro, A. C., Belo, M. A. de A., Soares, V. E., García, M. V., Mochi, D. A. (2005). Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens artificialmente infestadas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40(6), 595-600.
- Behle, R. W., Jackson, M. A., Flor-Weiler, L. B. (2013). Efficacy of a granular formulation containing *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) microsclerotia against nymphs of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Economic Entomology*, 106(1), 57-63.
- Behle, R. W. y Jackson, M. A. (2014). Effect of fermentation media on the production, efficacy, and storage stability of *Metarhizium brunneum* microsclerotia formulated as a prototype granule. *Journal of Economic Entomology*, 107(2), 582-590.
- Benjamin, M. A., Zhioua, E., Ostfeld, R. S. (2002). Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 39(5), 723-728.
- Beys da Silva, W. O., Santi, L., Corrêa, A. P. F., Silva, L. A. D., Bresciani, F. R., Schrank, A., Vainstein, M. H. (2010a). The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle. *Fungal Biology*, 114, 911-916.
- Beys da Silva, W. O., Santi, L., Schrank, A., Vainstein, M. H. (2010b). *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. *Fungal Biology*, 114, 10-15.
- Bittencourt, V. R. E. P., Mascarenhas, A. G., Faccini, J. L. H. (1999). Mecanismo de infecção que fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. *Ciência Rural*, 29, 351-354.
- Braga, G. U. L., Flint, S. D., Messias, C. L., Anderson, A. J., Roberts, D. W. (2001a). Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 105, 874-882.
- Braga, G. U. L., Flint, S. D., Miller, C. D., Anderson, A. J., Roberts, D. W. (2001b). Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61 °N to 54°S. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78, 98-108.

- Brahma, R. K., Dixit, V., Sangwan, A. K., Doley, R. (2014). Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Haemaphysalis bispinosa* ticks (Acari: Ixodidae) of North East India by ITS2 and 16S rDNA sequences and morphological analysis. *Experimental and Applied Acarology*, 62, 253-265.
- Camargo, M. G., Golo, P. S., Angelo, I. C., Perinotto, W. M. S., Sá, F. A., Quinelato, S., Bittencourt, V. R. E. P. (2012). Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. *Veterinary Parasitology*, 188, 140-147.
- Camargo, M. G., Marciano, A. F., Sá, F. A., Perinotto, W. M. S., Quinelato, S., Gôlo, P. S., Angelo, I. C., Prata, M. C. A., Bittencourt, V. R. E. P. (2014). Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. *Veterinary Parasitology*, 205, 271-276.
- Castrillo, L. A., Roberts, D. W., Vandenberg, J. D. (2005). The fungal past, present, and future: Germination, ramification, and reproduction. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89, 46-56.
- Chagas, A. C. S., Domingues, L. F., Fantatto, R. R., Giglioti, R., Oliveira, M. C. S., Oliveira, D. H., Mano, R. A., Jacob, R. G. (2014). *In vitro* and *in vivo* acaricide action of juvenoid analogs produced from the chemical modification of *Cymbopogon* spp. and *Corymbia citriodora* essential oil on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, 205, 277-284.
- Charnley, A. K. (2003). Fungal pathogens of insects: Cuticle degrading enzymes and toxins. *Advances in Botanical Research*, 40, 241-321.
- Cordero, L. y Salas, J. L. (2000). *Enfermedades de los animales domésticos*. San José: EUNED. 130 p.
- da Silva, J. B., Rangel, C. P., de Azebedo-Baêta, B., da Fonseca, A. H. (2014). Analysis of the risk factors relating to cows' resistance to *Rhipicephalus microplus* ticks during the peripartum. *Experimental and Applied Acarology*, 63, 551-557.
- Dantigny, P. y Nanguy, S. P. -M. (2009). Significance of the physiological state of fungal spores. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 16-20.
- De Clercq, E. M., Leta, S., Estrada-Peña, A., Madder, M., Adehan, S., Vanwambeke, S. O. (2015). Species distribution modelling for *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Benin, West Africa: Comparing datasets and modelling algorithms. *Preventive Veterinary Medicine*, 118, 8-21.
- de Melo, D. R., Reis, R. C., Bittencourt, V. R. (2006). *In vitro* pathogenicity of the fungi *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, on the tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 15(4), 157-162.
- Duarte, M. O., Ferrarini, S. R., Pazinato, M., de Oliveira, E. R., Rolim, V., Eifler-Lima, V. L., Ribeiro, V. L. S., von Poser, G. (2008). Acaricidal activity of the hyacinthacine analogues derived from pyrrolizidine alkaloids on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitology Research*, 103, 723-726.
- Dutra, V., Nakazato, L., Broetto, L., Schrank, I. S., Vainstein, M. H., Schrank, A. (2004). Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus*. *Research in Microbiology*, 155, 245-251.
- Ekesi, S., Maniania, N. K., Mohamed, S. A., Lux, S. A. (2005). Effect of soil application of different formulations of *Metarhizium anisopliae* on African tephritid fruit flies and their associated endoparasitoids. *Biological Control*, 35, 83-91.
- Fang, W., Fernandes, É. K. K., Roberts, D. W., Bidochka, M. J., St. Leger, R. J. (2010). A laccase exclusively expressed by *Metarhizium anisopliae* during isotropic growth is involved in pigmentation, tolerance to abiotic stresses and virulence. *Fungal Genetics and Biology*, 47, 602-607.
- Fernandes, É. K. K., Costa, G. L., Moraes, Á. M. L., Zahner, V., Bittencourt, V. R. E. P. (2006). Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. *Parasitology Research*, 98, 324-332.
- Fernandes, É. K. K., Angelo, I. C., Rangel, D. E. N., Bahiense, T. C., Moraes, Á. M. L., Roberts, D. W., 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.

- Fernandes, É. K. K., Bittencourt, V. R. E. P., Roberts, D. W. (2012). Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Experimental Parasitology*, 130, 300-305.
- Flores-Fernández, J. M., Gutiérrez-Ortega, A., Rosario-Cruz, R., Padilla-Camberos, E., Álvarez, Á. H., Martínez-Velázquez, M. (2014). Molecular cloning and characterization of two novel autophagy-related genes belonging to the ATG8 family from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, 64, 533-542.
- Fogaça, A. C., Almeida, I. C., Eberlin, M. N., Tanaka, A. S., 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.
- Franco, K. G. C., Rodríguez, S. N., Cervantes, J. F. M., Barranco, J. E. F. (2011). Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. *Sociedades rurales, producción y medio ambiente*, 11(22), 143-160.
- Frazzon, G. A. P., Vaz Jr, I. S., Masuda, A., Schrank, A., Vainstein, H. M. (2000). *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 94, 117-125.
- Galay, R. L., Umemiya-Shirafuji, R., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T. (2015). Iron metabolism in hard ticks (Acari: Ixodidae): The antidote to their toxic diet. *Parasitology International*, 64, 182-189.
- Garcia, M. V., Monteiro, A. C., Szabó, M. P. J., Mochi, D. A., Simi, L. D., Carvalho, W. M., Tsuruta, S. A., Barbosa, J. C. (2011). Effect of *Metarhizium anisopliae* fungus on off-host *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from tick-infested pasture under cattle grazing in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 181, 267-273.
- Ghosh, S., Singh, N. K., Das, G. (2005). Assessment of duration of immunity in crossbred cattle immunized with glycoproteins isolated from *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Boophilus microplus*. *Parasitology Research*, 95, 319-326.
- 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.
- Ginsberg, H. S., Lebrun, R. A., Heyer, K., Zhioua, E. (2002). Potential nontarget effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) used for biological control of ticks (Acari: Ixodidae). *Environmental Entomology*, 31(6), 1191-1196.
- Gołębiowski, M., Maliński, E., Boguś, M. I., Kumirska, J., Stepnowski, P. (2008). The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 619-627.
- Guglielmo, A. A., Robbins, R. G., Apanaskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Peña, A., Horaz, I. G., Shao, R., Barker, S. C. (2010). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, 2528, 1-28.
- Herrera-Barrantes, A., Varela-Villalobos, E., Mata-Granados, X. (2010). Evaluación de la patogenicidad de *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp. para el combate de garrapatas *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) en bovinos de leche. Coria-Avalos, V.M., Lara-Chávez, M.B.N., Orozco-Gutiérrez, G., Muñoz-Flores, H.J., Sánchez-Martínez, R. (Eds.). In. XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico. (2010. Michoacán, México). Memoria 10-12 Nov. 577 p.
- Holdsworth, P. A., Kemp, D., Green, P., Peter, R. J., De Bruin, C., Jonsson, N. N., 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, V. L., Ostfeld, R. S., Zhioua, E., Benjamin, M. A. (2004). Sublethal effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) on engorged larval, nymphal, and adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 41(5), 922-929.

- Hornbostel, V. L., Zhioua, E., Benjamin, M. A., Ginsberg, H. S., Ostfeld, R. S. (2005). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) and permethrin to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) nymphs. *Experimental and Applied Acarology*, 35, 301-316.
- Jarrold, S. L., Moore, D., Potter, U., Charnley, A. K. (2007). The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycological Research*, 111, 240-249.
- Jonsson N. N., Davis, R., de Witt, M. (2001). An estimate of the economic effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on Queensland dairy farms. *Australian Veterinary Journal*, 79(12), 826-831.
- Kaaya, G. P., Samish, M., Hedimbi, M., Gindin, G., Glazer, I. (2011). Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. *Experimental and Applied Acarology*, 55, 273-281.
- Kabaluk, J. T. y Ericsson, J. D. (2007). Environmental and behavioral constraints on the infection of wireworms by *Metarhizium anisopliae*. *Environmental Entomology*, 36(6), 1415-1420.
- Kaufman, W. R. (2010). Ticks: Physiological aspects with implications for pathogen transmission. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 1, 11-22.
- Kirkland, B. H., Westwood, G. S., Keyhani, N. O. (2004). 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(4), 705-711.
- Kumar, B., Murugan, K., Ray, D. D., Ghosh, S. (2012). Efficacy of rBm86 against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (IVRI-I line) and *Hyalomma anatolicum anatolicum* (IVRI-II line) infestations on bovine calves. *Parasitology Research*, 111, 629-635.
- Kumsa, B., Socolovschi, C., Raoult, D., Parola, P. (2015). Spotted fever group rickettsiae in ixodid ticks in Oromia, Ethiopia. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 6, 8-15.
- Lecuona, R. E. (1996). *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. Buenos Aires. 338 p.
- Leemon, D. M. y Jonsson, N. N. (2008). Laboratory studies on australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, 40-49.
- Leemon, D. M., Turner, L. B., Jonsson, N. N. (2008). Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Veterinary Parasitology*, 156, 248-260.
- Leemon, D. M. y Jonsson, N. N. (2012). Comparison of bioassay responses to the potential fungal biopesticide *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Lucilia cuprina*. *Veterinary Parasitology*, 185, 236-247.
- 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, 500-510.
- López, E., López, G., Orduz, S. (2009). Control de la garrapata *Boophilus microplus* con *Metarhizium anisopliae*, estudios de laboratorio y campo. *Revista Colombiana de Entomología*, 35(1), 42-46.
- Lubeck, I., Arruda, W., Souza, B. K., Stanisquaski, F., Carlini, C. R., Schrank, A., Vainstein, M. H. (2008). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Ecology*, 1, 78-88.
- Martinez-Velazquez, M., Castillo-Herrera, G. A., Rosario-Cruz, R., Flores-Fernandez, J. M., Lopez-Ramirez, J., Hernandez-Gutierrez, R., Lugo-Cervantes, E., del C. (2011). Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 108, 481-487.
- Marufu, M. C., Dzama, K., Chimonyo, M. (2014). Cellular responses to *Rhipicephalus microplus* infestations in pre-sensitised cattle with differing phenotypes of infestation. *Experimental and Applied Acarology*, 62, 241-252.

- 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.
- Meyling, N. V. y Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43, 145-155.
- Miller, C. D., Rangel, D., Braga, G. U. L., Flint, S., Kwon, S. -I., Messias, C. L., Roberts, D. W., Anderson, A. J. (2004). Enzyme activities associated with oxidative stress in *Metarhizium anisopliae* during germination, mycelial growth, and conidiation and in response to near-UV irradiation. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 41-49.
- Monteiro, C. M. O., Araújo, L. X., Matos, R. S., da Silva-Golo, P., Angelo, I. C., de Souza-Perinotto, W. M., Coelho-Rodrigues, C. A., Furlong, J., Bittencourt, V. R. E. P., Prata, M. C. A. (2013). Association between entomopathogenic nematodes and fungi for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 112, 3645-3651.
- Monteiro, C. M. O., Araújo, L. X., Gomes, G. A., Senra, T. O. S., Calmon, F., Daemon, E., de Carvalho, M. G., Bittencourt, V. R. E. P., Furlong, J., Prata, M. C. A. (2014). Entomopathogenic nematodes associated with essential oil of *Lippia sidoides* for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 113, 189-195.
- Murrel, A. y Barker, S. C. (2003). Synonymy of *Boophilus* Crutice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, 56, 169-172.
- Ojeda-Chi, M. M., Rodríguez-Vivas, R. I., Galindo-Velasco, E., 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.
- 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.
- Olds, C., Bishop, R., Daubenberger, C. (2013). Anti-tick vaccines for the control of ticks affecting livestock. In: *Molecular vaccines: from prophylaxis to therapy*. Giese, M. (Ed.). p. 295-311.
- Onofre, S. B., Miniuk, C. M., de Barros, N. M., Azevedo, J. L. (2001). Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *American Journal of Veterinary Research*, 62(9), 1478-1480.
- Ortiz-Urquiza, A., Luo, Z., Keyhani, N. O. (2015). Improving mycoinsecticides for insect biological control. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 1057-1068.
- Ostfeld, R. S., Price, A., Hornbostel, V. L., Benjamin, M. A., Keesing, F. (2006). Controlling ticks and tick-borne zoonoses with biological and chemical agents. *BioScience*, 56(5), 383-394.
- Pedrini, N., Crespo, R., Juárez, M. P. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 146, 124-137.
- Perinotto, W. M. S., Angelo, I. C., Golo, P. S., Quinelato, S., Camargo, M. G., Sá, F. A., Bittencourt, V. R. E. P. (2012). Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. *Experimental Parasitology*, 130, 257-260.
- Polar, P., de Muro, M. A., Kairo, M. T. K., Moore, D., Pegram, R., Sally-Ann, J., Roach-Benn, C. (2005a). Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. *Veterinary Parasitology*, 134, 159-167.
- Polar, P., Kairo, M. T. K., Moore, D., Pegram, R., Sally-Ann, J. (2005b). Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. *Mycopathologia*, 160, 151-157.

- Polar, P., Moore, D., Kairo, M. T. K., Ramsubhag, A. (2008). Topically applied myco-acaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. *Experimental and Applied Acarology*, 46, 119-148.
- Pourseyed, S. H., Tavassoli, M., Bernousi, I., Mardani, K. (2010). *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales): An effective alternative to chemical acaricides against different developmental stages of fowl tick *Argas persicus* (Acari: Argasidae). *Veterinary Parasitology*, 172, 305-310.
- Pucheta-Díaz, M., Flores-Macías, A., Rodríguez-Navarro, S., De la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856-860.
- Qazi, S. S. y Khachatourians, G. G. (2007). Hydrated conidia of *Metarhizium anisopliae* release a family of metalloproteases. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95, 48-59.
- Quinelato, S., Golo, P. S., Perinotto, W. M. S., Sá, F. A., Camargo, M. G., Angelo, I. C., Moraes, A. M. L., Bittencourt, V. R. E. P. (2012). Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. *Veterinary Parasitology*, 190, 556-565.
- Rajput, Z. I., Hu, Song-hua., Chen, Wan-jun., Arijó, A. G., 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.
- Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., Anderson, A. J., Roberts, D. W. (2005). Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88, 116-125.
- Reck, J., Klafke, G. M., Webster, A., Dall'Agnol, B., Scheffer, R., Souza, U. A., Corassini, V. B., Vargas, R., dos Santos, J. S., Martins, J. R. S. (2014). First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. *Veterinary Parasitology*, 201, 128-136.
- Reis-Menini, C. M. R., Prata, M. C. A., Furlong, J., Silva, E. R. (2008). Compatibility between the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and an acaricide in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 103, 1391-1396.
- Ren, Q., Liu, Z., Guan, G., Sun, M., Ma, M., Niu, Q., Li, Y., Liu, A., Liu, J., Yang, J., Yin, H, Luo, J. (2012). Laboratory evaluation of virulence of Chinese *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to engorged female *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. *Biological Control*, 63, 98-101.
- Ribeiro, V. L. S., Rolim, V., Bordignon, S., Henriques, A. T., Dorneles, G. G., Limberger, R. P., von Poser, G. (2008). Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasitology Research*, 102, 531-535.
- Roberts, D. W. y St. Leger, R. J. (2004). *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology*, 54, 1-70.
- Rodríguez-Alcocer, U. J., Rodríguez-Vivas, R. I., Ojeda-Chi, M. M., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R. (2014). Efficacy the mixture of two strains of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to control *Rhipicephalus microplus* on natural infestation of cattle. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17, 223-229.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Ojeda-Chi, M. M., Rosado-Aguilar, J. A., Trinidad-Martínez, I. C., Torres-Acosta, J. F. J., Ticante-Perez, V., Castro-Marín, J. M., Tapia-Moo, C. A., Vázquez-Gómez, G. (2013). Red deer (*Cervus elaphus*) as a host for the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. *Experimental and Applied Acarology*, 60, 543-552.
- Romo-Martínez., Fernández-Ruvalcaba, M., Hernández-Velázquez, V. M., Peña-Chora, G., Lina-García, L. P., Osorio-Miranda, J. (2013). Evaluation of natural origin products for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle artificially infested. *Basic Research Journal of Agricultural Science and Review*, 2(3), 64-79.
- Rosario-Cruz, R., Guerrero, F. D., Miller, R. J., Rodriguez-Vivas, R. I., Tijerina, M., Dominguez-Garcia, D. I., Hernandez-Ortiz, R., Cornel, A. J., McAbee, R. D., Alonso-Diaz, M. A. (2009). Molecular survey of

- pyrethroid resistance mechanisms in Mexican field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitology Research*, 105, 1145-1153.
- Sandhu, S. S., Sharma, A. K., Beniwal, V., Goel, G., Batra, P., Kumar, A., Jaglan, S., Sharma, A. K., Malhotra, S. (2012). Myco-biocontrol of insect pests: factors involved, mechanism, and regulation. *Journal of Pathogens*, doi:10.1155/2012/126819
- Santi, L., Beys da Silva, W. O., Berger, M., Guimarães, J. A., Schrank, A., Vainstein, M. H. (2010a). Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*, 55, 874-880.
- Santi, L., Silva, W. O. B., Pinto, A. F. M., Schrank, A., Vainstein, M. H. (2010b). *Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. *Fungal Biology*, 114, 312-319.
- Sapna, N. B., Remadevi, O. K., Sasidharan, T. O., Balachander, M., Priyadarsanan Dharmarajan. (2012). Cuticle degrading enzyme production by some isolates of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). *Journal of Biosciences*, 20, 25-32.
- Schrank, A. y Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56, 1267-1274.
- 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.
- Shyma, K. P., Gupta, J. P., Ghosh, S., Patel, K. K., Singh, V. (2014). Acaricidal effect of herbal extracts against cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* using *in vitro* studies. *Parasitology Research*, 113, 1919-1926.
- Sun, M., Ren, Q., Guan, G., Liu, Z., Ma, M., Gou, H., Chen, Z., Li, Y., Liu, A., Niu, Q., Yang, J., Yin, H., Luo, J. (2011). Virulence of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* to the engorged female *Hyalomma anatolicum anatolicum* tick (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 180, 389-393.
- Téllez-Jurado, A., Cruz, M. G. R., Mercado, Y. F., Asaff, A. T., Arana-Cuenca, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*, 30, 73-80.
- Valverde-Sánchez, A. L., Mata-Granados, X., Lezama-Gutiérrez, R., Camacho-Calvo, M. (2015). *Evaluación de Metarhizium anisopliae (Hypocreales: Clavicipitaceae) en mezcla con ixodícidicos químicos sobre larvas de Rhipicephalus microplus (Canestrini) (Acari: Ixodidae) bajo condiciones de invernadero*. Manuscrito no publicado.
- Velayutham, V., Shanmugavel, S., Munusamy, A., Sundaram, J. (2012). Detection of genetic variability in various isolates of cattle tick, *Boophilus microplus* from Tamil Nadu, India using PCR-RAPD analysis. *Experimental and Applied Acarology*, 56, 375-383.
- Villarino, M. A., Wagner, G. G., George, J. E. (2002). *In vitro* detection of acaricide resistance in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, 28, 265-271.
- Wang, C. y St. Leger, R. J. (2006). A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17), 6647-6652.
- Webster, A., Reck, J., Santi, L., Souza, U. A., Dall'Agnol, B., Klafke, G. M., Beys-da-Silva, W. O., Martins, J. R., Schrank, A. (2015). Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. *Veterinary Parasitology*, 207, 302-308.
- Zeringóta, V., Senra, T. O. S., Calmon, F., Maturano, R., Faza, A. P., Catunda-Junior, F. E. A., Monteiro, C. M. O., de Carvalho, M. G., Daemon, E. (2013). Repellent activity of eugenol on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 112, 2675-2679.

Zhang, L. y Hunter, D. M. (2005). Laboratory and field trials of Green Guard® (*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*) (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis*) (Orthoptera: Acrididae) in China. *Journal of Orthoptera Research*, 14(1), 27-30.