

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA CEPA MAF1309® DE *Metarhizium anisopliae*
EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE GARRAPATAS ADULTAS DE
Rhipicephalus microplus EN TUNJA, COLOMBIA**

***Evaluation of Efficacy of MaF1309® Strain of Metarhizium anisopliae in Biological
Control of Adult Ticks Rhipicephalus microplus in Tunja, Colombia***

Martín O. Pulido-Medellín^{*1}, Roger I. Rodríguez-Vivas^{**}, Diego J. García-Corredor^{*},
Adriana M. Díaz-Anaya^{*} y Roy J. Andrade-Becerra^{*}

^{*}Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. ^{**}Facultad de
Medicina Veterinaria, Universidad Autónoma de Yucatán, México.

Correo-E:mopm1@hotmail.com

Recibido: 09/02/15 - Aprobado: 04/11/15

RESUMEN

La garrapata del ganado *Rhipicephalus microplus* constituye el ectoparásito de mayor importancia en las ganaderías de regiones tropicales y subtropicales, al producir pérdidas directas por reducción de la producción de carne, leche y deterioro de las pieles así como a la transmisión de agentes patógenos para el ganado bovino tales como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*. El tratamiento químico ha sido efectivo para el control de las garrapatas; sin embargo, su uso excesivo ha propiciado la selección de individuos resistentes y por tal motivo, se hace necesario el desarrollo de nuevas alternativas de control, tales como el uso de hongos entomopatógenos. El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia *in vitro* de *M. anisopliae* para el control de la fase adulta de *R. microplus*, en Tunja, Colombia. Se usó la prueba de inmersión de adultas para evaluar la eficacia de la cepa MaF1309® de *M. anisopliae* a las siguientes concentraciones: 1×10^4 , 1×10^6 y 1×10^8 conidias/mL. Se observó que en las garrapatas tratadas a una concentración de 1×10^8 conidias/mL se alcanzó el 100% de mortalidad a los 14 d postratamiento (PT), mientras que las concentraciones 1×10^6 y 1×10^4 conidias/mL

ABSTRACT

The livestock tick *Rhipicephalus microplus* is a high importance ectoparasite in cattle raised at tropical and sub-tropical regions producing direct losses since reduce meat and milk production and cause leather injury besides transmission of pathogenic agents such as *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*. The chemical treatment has been effective to control tick however the excessive use has selected resistant individuals; for that reason is important to develop new alternatives such as entomopathogen fungi to keep controlled those individuals. The objective of this research was to evaluate *in vitro* efficacy of *M. anisopliae* to control adult stage of *R. microplus* in Tunja, Colombia. The immersion test was used to evaluate efficacy of MaF1309® strain of *M. anisopliae* at concentrations of 1×10^4 , 1×10^6 y 1×10^8 conidia/mL. The group of ticks treated with 1×10^8 conidia had 100% of mortality 14 post-treatment days (PT), otherwise 1×10^6 y 1×10^4 conidia/mL concentrations have 100% of mortality at 16 and 20 PT days, respectively. Mortality was directly proportional to fungus concentration used, the ticks treated with high concentrations reach high mortality in less time. Those *in vitro* results start in

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

alcanzaron el 100% de mortalidad a los días 16 y 20 PT, respectivamente. La mortalidad fue directamente proporcional a la concentración empleada del hongo, siendo las garrapatas tratadas con concentraciones mayores aquellas que alcanzaron una mortalidad en menor tiempo. Estos resultados *in vitro* son considerados el inicio de información de tipo local proyectados al diseño de programas de control para el departamento de Boyacá.

(Palabras clave: Control biológico; hongos entomopatógenos; *Rhipicephalus microplus*; *Metarhizium anisopliae*)

local information projected to design control programs for the department of Boyacá.

(Key words: Biological control; entomogenous fungi; *Rhipicephalus microplus*; *Metarhizium anisopliae*)

INTRODUCCIÓN

En zonas tropicales y subtropicales del mundo las garrapatas transmiten microorganismos patógenos (protozoos, rickettsias, espiroquetas y virus) a humanos y animales [1]. La garrapata común del ganado *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) [2], es sin duda el artrópodo que parasita con mayor frecuencia al ganado bovino en Australia, parte de África, así como Centro y Sudamérica incluyendo a Colombia [3-6]. Este ectoparásito afecta aproximadamente el 80% de la población bovina de las regiones señaladas, encontrándose en un amplio rango de altitud y temperatura que va desde el nivel del mar hasta los 2700 m.s.n.m. y a temperaturas que oscilan entre 15°C y 34°C [3].

Debido a su hábito hematófago, *R. microplus* produce daños directos al ganado al consumir sangre, reducir la ganancia de peso, producir daños a la piel por acción de las picaduras, debilitamiento, estrés, así como la disminución de la producción de leche y menor eficiencia reproductiva del hato [7, 8]. Asimismo, puede transmitir agentes patógenos como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* [9]; considerados de alto impacto, al originar altos índices de morbilidad y mortalidad en los animales afectados [4, 5].

En Colombia se calcula que las pérdidas asociadas con las garrapatas y moscas para la ganadería ascienden a 76.713 millones de pesos anuales [3].

El control de las garrapatas en la ganadería bovina se basa principalmente en el uso de productos químicos comerciales tales como los organofosforados, amidinas, piretroides sintéticos y lactonas macrocíclicas.

El control biológico mediante el uso de hongos entomopatógenos ha demostrado ser una alternativa promisoriosa y económicamente prometedor para el control de garrapatas en los bovinos [8,10,11]. El hongo *Metarhizium anisopliae* es uno de los organismos que mayor potencial tiene para el control de diferentes estadios de *R. microplus*. Este hongo invade activamente la garrapata a través de su cutícula y produce su daño patológico al presionarla mecánicamente (apresorios) y degradarla por la acción de enzimas hidrolíticas tales como proteasas, quitinasas y lipasas [12, 13]. En Colombia, López et al. [14], evaluaron la capacidad biocontroladora de ocho cepas de *M. anisopliae* sobre *R. microplus* en condiciones de laboratorio y campo. En condiciones de laboratorio, se encontró que la cepa 137bm causó el efecto más significativo al disminuir la oviposición de las garrapatas hasta en un 96% y viabilidad de los huevos en más del 98%. En ensayos de campo se logró reducir la infestación de garrapatas en un 75% en vacas y un 86% en praderas. Se observó que la eficacia del hongo es variable dependiendo de la cepa estudiada, la concentración y la fase de desarrollo de la garrapata. Por tal motivo es necesario evaluar cepas de distintos orígenes para seleccionar las de mejor potencial biológico para el control de *R. microplus*; por lo tanto, el objetivo del presente

estudio fue evaluar la eficacia, en condiciones *in vitro*, de la cepa MaF1309 del hongo *M. anisopliae* para el control de la fase adulta de *R. microplus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Parasitología de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, en la ciudad de Tunja, Boyacá, Colombia, ubicada en las coordenadas 5° 32' 7" N, 73° 22' 04" O. La temperatura promedio anual es de 13°C con una altitud de 2690 m.s.n.m. y una precipitación de 645 mm al año [15].

Cepa de *M. anisopliae* y Condiciones de Cultivo

Para el estudio se usó la cepa comercial MaF1309® del hongo *M. anisopliae*. El hongo se obtuvo de un producto comercial puro, que fue cultivado en medio agar dextrosa Sabouraud [16], enriquecido con 1% de extracto de levadura y mezclado con 500 ppm de cloranfenicol. El cultivo se incubó por tres semanas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con una humedad relativa del 70% [17]. Las conidias se obtuvieron mediante el raspado de la superficie del medio de cultivo y suspendidas en agua destilada estéril con 0,1% v/v [18]. Mediante el uso de hematocitómetro de *Neubauer* se determinó la concentración de conidias por mL, y posteriormente se cuantificaron ajustando las concentraciones empleadas para este estudio: 1×10^4 , 1×10^6 y 1×10^8 conidias/mL.

Recolección de Hembras Adultas de *R. microplus*

En el municipio de Moniquirá, Boyacá, Colombia, se colectaron garrapatas adultas repletas de *R. microplus* de al menos 30 bovinos. Las garrapatas fueron transferidas a cápsulas de *Petri* para ser transportadas en condiciones de ambiente al laboratorio de Parasitología de la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (FMVZ-UPTC). Las garrapatas fueron pesadas en una balanza analítica y luego lavadas con agua destilada y cloro a una concentración de 0,3%. El promedio de garrapatas por tratamiento fue de $218 \pm 1,4$ mg. Para evaluar la eficacia del hongo *M. anisopliae* se

utilizó la prueba de inmersión de adultas, de acuerdo con la metodología descrita por Drummond [19].

Bioensayo

Doscientas cuarenta garrapatas adultas de *R. microplus* fueron empleadas para el ensayo. Se realizó un diseño experimental completamente al azar con 20 garrapatas por tratamiento y tres repeticiones, siendo cada garrapata inoculada como una unidad experimental y evaluándose los siguientes tratamientos: Tratamiento 1: Tratado con la cepa *M. anisopliae* a una concentración de 1×10^4 conidias/mL. Tratamiento 2: Tratado con la cepa *M. anisopliae* a una concentración de 1×10^6 conidias/mL. Tratamiento 3: Tratado con la cepa *M. anisopliae* a una concentración de 1×10^8 conidias/mL. Tratamiento 4: Grupo control, que consistió en usar agua destilada como placebo. Las garrapatas de cada grupo fueron sumergidas durante un minuto en 1,5 mL en sus correspondientes tratamientos y depositadas posteriormente en microplacas de 24 pozos para ser incubadas a una temperatura de 28° C y 90% de humedad durante 20 d. Las garrapatas fueron examinadas individualmente al microscopio para la detección de crecimiento fungal. Cada 48 h postratamiento, se registró la mortalidad de las garrapatas a través de observaciones al estereoscopio durante 20 d. Las garrapatas fueron consideradas muertas, cuando no mostraron movimiento alguno al ser estimuladas y presentaban micelios emergiendo a través de la cutícula. Para estimar el porcentaje de mortalidad se usó la siguiente fórmula descrita por Soberanes *et al.* [20]:

$$\% \text{ de mortalidad en garrapatas} = \frac{\% \text{ de mortalidad del grupo tratado} - \% \text{ de mortalidad del grupo control} \times 100}{100 \% \text{ de mortalidad del grupo control}}$$

Asimismo, se obtuvo el porcentaje de eficacia de *M. anisopliae* mediante la fórmula descrita por Bittencourt *et al.* [21]:

$$\% \text{ de eficacia} = \frac{A - B \times 100}{A}$$

A = media de garrapatas adultas en el grupo control
B = media de garrapatas adultas en el grupo tratado

Para determinar el índice de eficiencia reproductiva, las garrapatas de cada grupo se pesaron al inicio del experimento. A los 15 d postratamiento, se recolectó la masa de huevos y de manera individual se pesaron. Para calcular el índice de oviposición y el porcentaje de inhibición de la oviposición se emplearon las

$$\text{Índice de oviposición (IO)} = \frac{\text{peso de los huevos puestos g}}{\text{Peso de las garrapatas hembras}}$$

$$\% \text{ de inhibición de la oviposición} = \frac{(\text{IO}) \text{ peso de huevos del control} - (\text{IO}) \text{ peso del huevos de tratamiento} \times 100}{\text{peso de huevos del control}}$$

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza (One-way ANOVA), para comparar el porcentaje de mortalidad y el índice de eficiencia reproductiva con la aplicación de los tratamientos de la cepa MaF1309® (1×10^4 , 1×10^6 y 1×10^8 conidias/mL) y un grupo control. En aquellos casos que se presentó diferencia se aplicó la prueba de Tukey, usando el software IBM SPSS para Windows versión 19.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los hongos entomopatógenos constituyen una alternativa biológica para el control de insectos, siendo *M. anisopliae* el más utilizado como biopesticida para el control de garrapatas [23]. En el presente estudio se logró evidenciar la eficacia de la cepa MaF1309® de *M. anisopliae* sobre la fase adulta de *R. microplus* en la población estudiada. Se observó que a mayor concentración del hongo se alcanza mayor mortalidad de garrapatas en menor tiempo. Esto coincide con los resultados obtenidos por Arguedas *et al.* [24] y Fernández *et al.* [25], quienes encontraron que la mortalidad fue directamente proporcional a la concentración empleada del hongo.

En el Cuadro 1, se presenta el porcentaje de mortalidad de garrapatas adultas de *R. microplus* expuestas a distintas concentraciones de *M. anisopliae*. Se observa que las garrapatas tratadas con la cepa MaF1309® a una concentración de 1×10^8 conidias/mL alcanzaron el 100% de mortalidad a los 14 d PT, mientras que la concentración de 1×10^6 conidias/mL a los 16 d y la concentración de 1×10^4 conidias/mL a los 20 d.

Las garrapatas presentaron el 50% de fungosis a los 10, 18 y 22 d con los tratamientos 1×10^8 conidias/mL, 1×10^6 conidias/mL y 1×10^4 conidias/mL, respectivamente. La concentración 1×10^8 conidias/mL mostró mayor micosis (100% al día 18 PT) que los tratamientos con 1×10^6 y 1×10^4 conidias/mL ($P < 0,001$). Con respecto a la eficiencia reproductiva de garrapatas adultas de *R. microplus*, se encontró que las concentraciones 1×10^4 , 1×10^6 y

1×10^8 tuvieron una reducción de 90%, 91% y 68%, respectivamente, donde a mayor concentración del hongo menor eficiencia reproductiva de las garrapatas ($P < 0,045$) (Figura 1). El mismo comportamiento se presentó cuando se evaluó el porcentaje de eclosión de larvas con valores de 76%, 56% y 32%, a las concentraciones del hongo de 1×10^4 conidias/mL, 1×10^6 conidias/mL y 1×10^8 conidias/mL, respectivamente.

En el presente estudio se logró una mortalidad de 100% de garrapatas adultas a los 14 d PT. En estudios previos se demostró que el hongo *M. anisopliae* es altamente efectivo para el control de *B. microplus*. Frazzon *et al.* [26], utilizaron 12 cepas de *M. anisopliae* (E6S1, E6S2, E9, RJc, RJd, AL, MT, CG144, M5, CG343, CG423 y CG491), de las cuales las cepas E6S1, E6S2, E9 y CG491 presentaron 50% de mortalidad a los 5 d postinfección y fue hasta la segunda semana luego de haber sido expuestas las garrapatas a una segunda inmersión cuando presentaron mortalidad del 100% con las cepas E6S1, E6S2, E9, RJc, RJd, AL, MT, CG144, y CG491, a la dilución de 1×10^7 ; sin embargo, las cepas M5 y CG423 tuvieron baja eficacia. Kirkland *et al.* [27], en un experimento con garrapatas adultas de *Amblyomma maculatum* y *Amblyomma americanum* utilizando la cepa ATCC20500, observaron 60% y 15% de mortalidad a la dilución de 1×10^8 conidias/mL a 28 d post-infección, mientras que Fernández *et al.* [25] utilizando dos grupos de garrapatas (resistentes y susceptibles), encontraron que la cepa ESC1 de *M. anisopliae* a la dilución de 1×10^8 conidias/mL fue altamente efectiva para ambos grupos a los 20 d post-infección obteniendo 100% de mortalidad. Asimismo, Gindin *et al.* [28], utilizaron la cepa Ma7 de *M. anisopliae*, obteniendo de 80% a 100% de mortalidad a los 7 d post-infección, en garrapatas adultas de *R. annulatus*. Estos estudios coinciden con el presente, respecto a la eficacia del hongo entomopatógeno *M. anisopliae*, pero varía dependiendo de la cepa y la concentración utilizada. Según Frazzon *et al.* [26] y Kirkland *et al.* [27], esta diferencia en la eficacia depende principalmente de la capacidad de la cepa del hongo para penetrar la cutícula de la garrapata, usando una combinación de mecanismos enzimáticos (proteasas, quitinasas) y físicos (mecanismos de presión).

En el presente estudio se puede resaltar, que todas

Cuadro 1. Eficacia de la cepa MaF1309 (1×10^4 , 1×10^6 y 1×10^8 conidias/mL) de *M. anisopliae* para el control de garrapatas adultas de *R. microplus*

Concentración (Conidias/mL)	Días PT	Eficacia (%)									
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
1×10^4		0	0	6,7	6,7	13,3	13,3	26,7	53,3	83,3	100
1×10^6		0	0	13,3	13,3	26,7	70	86,7	100	100	100
1×10^8		0	0	16,7	16,7	30	60	100	100	100	100
Control		0	0	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	20	53,3	60

las concentraciones evaluadas obtuvieron casi 100% de mortalidad a los 20 d PT; no obstante, la concentración 1×10^8 conidias/mL mostró los mejores resultados en el control de hembras adultas de *R. microplus*, hallazgo que coincide con Ojeda-Chi *et al.* [29] quienes usaron la cepa Ma14 a concentración de 1×10^8 conidias/mL y encontraron un 100% de mortalidad al día 14 PT. Asimismo, esta concentración del hongo mostró mayores signos de micosis (100% al día 18 PT), en comparación con las menores concentraciones ($P < 0,001$), situación similar a la de otros estudios al evaluar esta misma concentración con las cepas Ma14 [29] y E6S1 [13].

De igual forma, se evaluó el índice de eficiencia reproductiva en garrapatas adultas de *R. microplus* tratadas con la cepa MaF1309 de *M. anisopliae*, y se encontró que las tres concentraciones tuvieron una reducción entre 68 a 91%, siendo mayor el efecto cuando la concentración del hongo fue mayor ($p < 0,045$). Perinotto *et al.* [30] observaron efectos negativos de este hongo en los parámetros reproductivos de *R. microplus* resultando en una reducción del peso en los huevos y el porcentaje de

eclosión de larvas. Bittencourt *et al.* [31] encontraron que dos cepas (E9 y 319) de *M. anisopliae* redujeron la eficiencia reproductiva de garrapata *B. microplus*. Gindin *et al.* [28] trabajando con *B. annulatus* encontraron que una cepa de *M. anisopliae* reduce la oviposición de 7 a 8% y Hornbostel *et al.* [32] obtuvieron una reducción en la oviposición de 33% a 50%, cuando se utilizó una cepa de *M. anisopliae* para el control de *Ixodes scapularis*. Perinotto *et al.* [33] observaron que en los huevos tratados con *M. anisopliae* disminuyó entre el 50,5 y 57,3% la eclosión, con un aislamiento de la cepa Ma959 y una concentración de 1×10^8 conidias/mL. Estos hallazgos demuestran que la cepa estudiada a una concentración de 1×10^8 conidias/mL⁻¹ reduce la capacidad reproductiva de las garrapatas, tal como lo demostraron Webster *et al.* [34] luego de aplicar una formulación del hongo a una concentración de 1×10^8 conidias/mL en animales con *R. microplus*, el resultado fue evidenciado en una reducción significativa en la producción y eclosión de los huevos. En la Figura 2, se evidencia que al evaluar el porcentaje de eclosión de larvas, se encontró que la concentración de 1×10^8 conidias/mL produce la

Figura 1. Índice de eficiencia reproductiva de garrapatas adultas de *R. microplus* con las concentraciones de 1×10^4 , 1×10^6 y 1×10^8 conidias/mL de la cepa MaF1309® de *M. anisopliae*

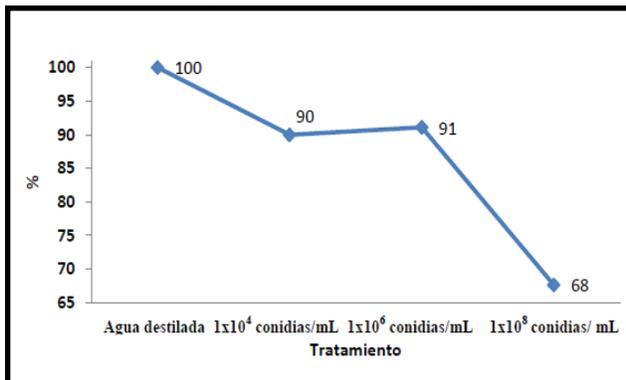
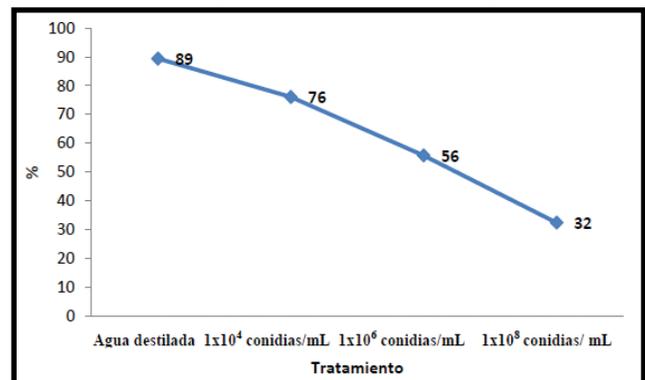


Figura 2. Porcentaje de eclosión de huevos de garrapatas adultas de *R. microplus* con las concentraciones de 1×10^4 , 1×10^6 y 1×10^8 conidias/mL de la cepa MaF1309® de *M. anisopliae*



menor eclosión de larvas (32%).

Los resultados de este estudio demostraron que la cepa MaF1309® de *M. anisopliae* es eficaz para el control de *R. microplus* en condiciones *in vitro*, siendo la concentración de 1×10^8 conidias/mL la que presentó mejores resultados. Este hongo representa una buena alternativa para el control de *R. microplus*, ya que se ha demostrado que no produce efectos adversos al medio ambiente y reduce los impactos ecológicos, ambientales y sanitarios que se producen al aplicar productos químicos de manera indiscriminada para el control de garrapatas [8, 35]. Estos resultados deberán ser validados en condiciones *in vivo*, ya que donde existen otros factores por evaluar tales como el hospedero y el ambiente.

CONCLUSIONES

La cepa MaF1309® de *M. anisopliae* es eficaz para el control de *R. microplus* en condiciones *in vitro* para este estudio, siendo la concentración de 1×10^8 conidias/mL la que produce mayor mortalidad de adultas, mayor fungosis y reduce en mayor proporción la ovoposición y la eclosión de larvas de *R. microplus*.

DECLARACION DE CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran expresamente que no hubo conflicto de intereses durante el desarrollo de este trabajo.

APORTE DE LOS AUTORES AL TRABAJO

MOPM: diseño del trabajo; muestreo de campo, pruebas de laboratorio, escritura del artículo. RIRV: Asesoría pruebas de laboratorio, redacción del artículo. DJGC y AMDA: muestreo de campo, pruebas de laboratorio, escritura del artículo. RJAB: pruebas de laboratorio; escritura del artículo.

REFERENCIAS

1. Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology*. 2004; 129 (Suppl 1):S3-S14.
2. Murrel A, Barker SC. Synonymy of *Boophilus* *Crutice*, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst Parasitol*. 2003; 56:169-172.
3. Benavides E. Control de las pérdidas ocasionadas por los parásitos del ganado. Carta FEDEGAN. 2001; 69:52-63.
4. Osorno-Mesa E. Las garrapatas de la República de Colombia. Instituto Nacional de Salud. Biomédica. 2006; 26(3):317-336.
5. Cortes-Vécino JA, Betancourt-Echeverri JA, Argüelles-Cárdenas J, Pulido-Herrera LA. Distribución de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos y fincas del Altiplano Cundiboyacense (Colombia). *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica Cienc Tecnol Agropecu*. 2010; 11(1):73-84.
6. González ME. Manual Técnico: Control de parásitos internos y externos que afectan al ganado bovino en Yucatán, México. 2011; 1-52.
7. Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Vivas RI, Fragosó-Sánchez H, Rosario-Cruz R. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Arch Med Vet* 2006; 38(2):105-113.
8. Rodríguez-Vivas RI, Arieta-Román JR, Perez-Cogollo LC, Rosado-Aguilar JA, Ramírez-Cruz GT, Basto-Estrella G. Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el ganado bovino. *Arch Med Vet*. 2010; 42:115-123.
9. Rodríguez-Vivas RI, Hodgkinson JE, Trees AJ. Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia. *Rev Mex Cienc Pecu*. 2012; 3(Supl 1):9-24.
10. Quinelato S, Golo P, Perinotto W, Sá F, Camargo M, Angelo I, et al. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. *Vet Parasitol*. 2012; 190:556-565.
11. Rot A, Gindinb G, Ment D, Mishoutchenko A, Glazer I, Samishb M. On-host control of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Acari: Ixodidae) by *Metarhizium brunneum* (*Hypocreales: Clavicipitaceae*). *Vet Parasitol*. 2013; 193:229-237.
12. Bittencourt VREP, Mascaranhas AG, Faccini JLH. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. *Ciência Rural*. 1999; 29:351-354.
13. Guedes A, Da-Silva I, Masuda A, Schrank A, Henning M. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol*. 2000; 94(1-2):117-125.
14. López E, López G, Orduz S. Control de la garrapata *Boophilus microplus* con *Metarhizium anisopliae*, estudios de laboratorio y campo. *Rev Colomb Entomol*. 2009; 35(1):42-46.
15. Rojas E, Arce B, Peña A, Boshell F, Ayarza M. Cuantificación e interpolación de tendencias locales de temperatura y precipitación en zonas alto andinas de Cundinamarca y Boyacá (Colombia). *Revista Corpoica*

- Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 2010; 11(2): 173-182.
16. Moorhouse ER, Gillespie AT, Charnley AK. Selection of virulent and persistent *Metarhizium anisopliae* isolates to control black vine weevil (*Otiorynchus sulcatus*) larvae on glasshouse begonia. J Invertebr Pathol. 62: 47-52.
 17. Barson G, Renn R, Bywater FA. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animal units. J Invertebr Pathol. 1994; 64: 107-113.
 18. Fernández M, Berlanga A, Cruz C, Hernández V. Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la inhibición de oviposición, eclosión y potencial reproductivo en una cepa triple resistente de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). Rev Entomotrópica. 2010; 25(3):109-115.
 19. Drummond RO, Whetstone TM. Oviposition of the gulf coast tick. J Econ Entomol. 1969; 63: 1547-1551.
 20. Soberanes CN, Santamaría M, Fragoso H, García Z. First case reported of Amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus* in Mexico. Téc Pecu Méx. 2001; 40(1):81-92.
 21. Bittencourt VREP, Bahiens TC, Fernandes EKK, De-Souza EJ. Avaliação da ação *in vivo* de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1833 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae). Rev Bra Parasitol Vet. 2003; 12:38-42.
 22. Ribeiro VL, Toigo E, Bordignon AS, Gonçalves K, Von Poser G. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. Vet Parasitol. 2007; 147(1-2): 199-203.
 23. Ojeda-Chi MM, Rodriguez-Vivas RI, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutierrez R, Cruz-Vazquez C. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revisión. Rev Mex Cienc Pecu 2011; 2(2):177-192.
 24. Arguedas M, Álvarez V, Bonilla R. Eficacia del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) Rev. Agronomía Costarricense 2008; 32(2): 137-147.
 25. Fernández M, Zhioua E, García Z. Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* sensible y resistente a los organofosforados. Tec Pecu Mex. 2005; 43(3):433-440.
 26. Frazzon AP, Vaz Junior I, Masuda A, Schrank A, Henning M. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. Vet Parasitol. 2000; 94: 117-125.
 27. Kirkland BH, Cho EM, Keyhani N. Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, Biological Control. 2004; 31: 414-421.
 28. Gindin G, Samish M, Alekseev E, Glazer I. The susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) ticks to entomopathogenic fungi biocontrol. Sci Technol. 2001; 11:111-118.
 29. Ojeda-Chi MM, Rodriguez-Vivas RI, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutierrez R. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. Vet Parasitol; 2010; 170:348-354.
 30. Perinotto W, Golo P, Coutinho RC, Sá F, Santi L, Beys da Silva W, et al. Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence of *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus*. Vet Parasitol. 2014; 203:189-196.
 31. Bittencourt V, Melo D, Reis R. *In vitro* patogenicity of the fungi *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff 1879) Sorokin, 1883, on the *Boophilus microplus* (canestrini 1887). Rev Bra Parasitol Vet. 2006; 15(4):157-162.
 32. Hornbostel V, Ostfeld R, Zhioua E. Sublethal effect of *Metarhizium anisopliae* (deuteromycetes) on engorged larval nymphal and adult ixodes escapularis (acaris: ixodidae). J Med Entomol. 2004; 41(5):922-929.
 33. Perinotto WMS, Angelo IC, Gôlo PS, Quinelato S, Camargo MG, Sá F, Bittencourt VREP. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. Exp Parasitol 2012; 130:257-260.
 34. Webster A, Reck J, Santi L, Souza UA, Dall'Agnol B, Klafke GM, et al. 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. Vet Parasitol. 2014; 205:271-276.
 35. Fernandes EKK, Bittencourt VREP. Entomopatogenic fungi against South American tick species. J Exp Appl Acarol. 2008; 46:71-93.