

Control de la garrapata *Boophilus microplus* con *Metarhizium anisopliae*, estudios de laboratorio y campo

Control of the cattle tick *Boophilus microplus* with *Metarhizium anisopliae*, laboratory and field studies.

ELKIN LÓPEZ^{1,4}, GUSTAVO LÓPEZ² y SERGIO ORDUZ^{3,4}

Resumen: Se evaluó la capacidad biocontroladora de ocho cepas *Metarhizium anisopliae* sobre la garrapata *Boophilus microplus* en condiciones de laboratorio y campo. La cepa 137bm causó el efecto más fuerte sobre la capacidad reproductiva de la garrapata, disminuyendo la oviposición de la garrapatas del 90 al 96% cuando las garrapatas adultas fueron tratadas in vitro con 1×10^8 y 1×10^9 conidias/ml. También redujo la viabilidad de los huevos de este artrópodo en más del 98% en las mismas dosis. En ensayos de campo se logró reducir la infestación de garrapatas en un 75% en vacas Holstein x Cebú, cuando se aplicó *M. anisopliae* 137bm a una concentración de 1×10^8 conidias/ml. Además, se observó que la fecundidad de las garrapatas provenientes de vacas tratadas con *M. anisopliae* fue tres veces inferior que las del grupo control. Por otra parte, la cepa 137bm aplicada en la pradera a una concentración de 5×10^{12} conidias/ha, causó una disminución en la población de larvas en cerca del 86% una semana después de una aspersión con conidias de *M. anisopliae*.

Palabras clave: Control biológico. Fertilidad de garrapatas. Ganado Holstein x Cebú.

Abstract: The biocontrol potential of eight strains of *Metarhizium anisopliae* was evaluated for the cattle tick *Boophilus microplus* under laboratory and field conditions. The strain 137bm caused the highest effect on the reproductive capacity of the tick, decreasing tick oviposition by 90 and 96% when adult ticks were treated in vitro with 1×10^8 and 1×10^9 conidia/ml. It also reduced egg viability by more than 98% in the same doses. In the field trials it was possible to reduce tick infestation by 75% in Holstein x Cebú cows when *M. anisopliae* 137bm was applied at a concentration of 1×10^8 conidias/ml. Also, the fecundity of the ticks coming from cows treated with *M. anisopliae* was three times lower than that of the control group. On the other hand, strain 137bm applied to the meadow at a concentration of 5×10^{12} conidia/ha concentration caused a decrease in the larval tick population close to 86% one week after an application with conidia of *M. anisopliae*.

Key words: Biological control. Tick fertility. Holstein x Cebú cattle.

Introducción

La garrapata *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) es considerada como uno de los más importantes ectoparásitos del ganado bovino en los países tropicales debido a los daños directos que ocasiona y a los agentes infecciosos que transmite y que causan enfermedades como anaplasmosis y babesiosis (da Guedes *et al.* 2000; Costa *et al.* 2002). Las garrapatas se encuentran distribuidas en diferentes zonas en todo el mundo pero es principalmente en Centro y Sur América y el occidente de África donde generan las más grandes pérdidas económicas, que en años anteriores fueron calculadas entre US\$ 13.900 y 18.700 millones debido a que causan disminución en la producción de leche y carne, mortalidad del ganado, sin considerar el costo derivado de su control (Bittencourt *et al.* 1997; Kaaya y Asan 2000).

El control de las garrapatas se realiza comúnmente mediante acaricidas, pero por el desarrollo de resistencia (Rodríguez-Vivas *et al.* 2006), por la demanda de alimentos libres de residuos químicos y por el cuidado del ambiente, se sugiere la utilización de sistemas alternativos de control entre los que se pueden contar el empleo de nemátodos (Hill 1998), vacunas (Jonsson *et al.* 2000; Ruiz *et al.* 2007), bacterias (Hassanain *et al.* 1997), aceites esenciales (Prates *et al.* 1998) y hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* (Bals. Vuill, 1806)

y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879, Sorokin, 1883). Se ha reportado que estos hongos causan mortalidad en garrapatas adultas, a la vez que disminuyen su fecundidad (Bittencourt *et al.* 1997; Zhioua *et al.* 1997; Barcelos *et al.* 1998; Kaaya 2000; Guedes *et al.* 2000; Kaaya y Asan 2000; Benjamín *et al.* 2002; da Costa *et al.* 2002).

M. anisopliae es un hongo Deuteromycete, patógeno generalista que ataca un diverso grupo de insectos (Benjamín *et al.* 2002; Quesada-Moraga *et al.* 2004). Este hongo invade el cuerpo del artrópodo hospedero a través de la cutícula y posteriormente se reproduce en él, favoreciendo así la transmisión horizontal del hongo y además puede tener efecto sobre la reproducción del organismo que está siendo atacado (Quesada-Moraga *et al.* 2004). *M. anisopliae* ha sido utilizado comúnmente para el control de insectos entre los que se destacan hormigas, termitas, langostas y cucarachas entre otros, y también se ha usado para el control de ácaros y garrapatas (Souza *et al.* 1999; Bittencourt 2000; Kaaya y Asan 2000; López y Orduz 2003).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto patógeno de *M. anisopliae* sobre diferentes estados de desarrollo de la garrapata *B. microplus* mediante bioensayos en el laboratorio y pruebas en campo, utilizando ganado y pasto naturalmente infestados.

¹ Natural Control Ltda. La Ceja, Antioquia, Colombia, Km 3 vereda San Nicolás, Tel.: (574) 5536232, Correo electrónico: elopez34@gmail.com. Autor para correspondencia.

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES; Instituto Colombiano de Medicina Tropical ICMT, Medellín Colombia.

³ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Colombia.

⁴ Unidad de Biotecnología y Control Biológico, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia.

Materiales y Métodos

Cepas de hongos. Se utilizaron las cepas 77, 81, 94, 95, 115, 136 y 137bm de *M. anisopliae* que hacen parte de la colección de hongos de la Unidad de Biotecnología y Control Biológico de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Los hongos se cultivaron en agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 26°C por dos semanas. Las conidias de los hongos se cosecharon por lavado de la superficie del medio de cultivo con agua destilada estéril (Gindin *et al.* 2000).

Bioensayos en laboratorio. Se recolectaron garrapatas teleoginas *B. microplus* de vacas Holstein en el centro de acopio de ganado en la ciudad de Medellín, Colombia. Grupos de 10 garrapatas fueron lavadas, pesadas y posteriormente sumergidas durante tres minutos en suspensiones de conidias de cada cepa de *M. anisopliae* con un rango de concentración entre 10^3 y 10^9 conidias/ml. Posteriormente, las garrapatas se colocaron en cajas de Petri e incubaron a 26°C, 85-90% de humedad y fotoperíodo luz: oscuridad 12:12 horas por 21 días para permitir la ovoposición. Los huevos se recolectaron, pesaron e incubaron bajo las mismas condiciones para permitir la eclosión larvaria. Las garrapatas control se trataron con agua destilada estéril e incubaron bajo las mismas condiciones. Se registró la infección producida por el hongo en las garrapatas y el peso de los huevos ovipositados y posteriormente se registró el porcentaje de eclosión larvaria (Bittencourt *et al.* 1997; Zhioua *et al.* 1997; da Costa *et al.* 2002).

También se realizaron bioensayos con larvas de *B. microplus* obtenidas de teleoginas que se incubaron como se mencionó anteriormente. Las larvas se trataron con conidias de cada una de las cepas de *M. anisopliae* en un rango de concentración entre 10^3 y 10^9 conidias/ml. Se agregaron 3 ml de las suspensiones de conidias en cajas de petri con círculos de papel filtro. Posteriormente, se depositaron entre 300 y 500 larvas de 11 a 21 días de nacidas, se cubrieron con otro círculo de papel filtro y se agregaron nuevamente 3 ml de las suspensiones de conidias de *M. anisopliae*. Se incubaron por 3 min a temperatura ambiente y después las larvas se colocaron en tubos de ensayo cerrados con tapones de algodón e incubadas a 26°C, 85-90% de humedad por 10 días. Las larvas del grupo control se trataron con agua destilada estéril. Se evaluó la mortalidad larvaria de acuerdo con la técnica descrita por Souza *et al.* (1999) y Chagas *et al.* (2003).

Ensayos en campo. Se utilizó la cepa 137bm de *M. anisopliae* debido a que en los ensayos de laboratorio demostró una la mayor patogenicidad para las garrapatas que las otras cepas. *M. anisopliae* cepa 137bm fue producido por una empresa dedicada a la comercialización de microorganismos para control biológico y la formulación de las conidias incluye lactosa, talco y goma xantán. El ensayo se realizó en una finca situada a 1600 msnm en el municipio de Barbosa, 50 km al norte de Medellín, Colombia, con una temperatura promedio de 26°C y una humedad relativa entre 65-75%.

En la prueba se utilizaron 20 vacas del cruce Holstein x Cebú distribuidas en dos grupos de 10 animales cada uno. Un grupo de vacas fue bañado con una suspensión acuosa de conidias de *M. anisopliae* cepa 137bm a una concentración de 1×10^8 conidias/ml. Se aplicó 1 litro de la suspensión de conidias por cada 100 kg de peso del animal. El otro grupo de vacas sirvió como control y se utilizó solamente agua en la misma cantidad que el grupo tratado con el hongo. La elección de la

dosis utilizada en estas pruebas se hizo teniendo en cuenta los buenos resultados con esta concentración en pruebas de laboratorio y por el costo del tratamiento de un producto comercial.

Las aplicaciones se hicieron en tres ocasiones con una bomba de aspersión, con intervalos de una semana y se continuó el monitoreo por tres semanas después de la última aplicación. El seguimiento del experimento se realizó mediante el recuento semanal de garrapatas adultas con un tamaño superior a 4 mm en cada uno de los animales. Después de 48 horas de las aplicaciones de *M. anisopliae*, de cada una de las vacas se recolectaron garrapatas que fueron llevadas al laboratorio para determinar el peso de los huevos ovipositados y el porcentaje de eclosión larvaria. Los especímenes recogidos se trataron de igual forma como se mencionó en los bioensayos en laboratorio.

El hongo *M. anisopliae* cepa 137bm se aplicó también en el pasto (pradera) en parcelas de 9 m² con una dosis de 5×10^{12} conidias/ha. Se utilizó un potrero distinto al experimento con vacas y libre de ganado. Las aplicaciones y evaluaciones se hicieron en las mismas fechas en que se hizo el experimento con los bovinos. Se determinó el número de larvas de garrapatas en las parcelas contabilizando las larvas que se adherían a una tela blanca de 1 m² que se extendió sobre el pasto tres veces durante tres minutos en cada visita (Benjamín *et al.* 2002). Una parcela de igual tamaño que la anterior donde se aplicó solamente agua sirvió como control. Durante el período de observación no se permitió al ganado pastorear en esas parcelas.

Análisis de datos. Se obtuvieron índice de producción de huevos (IPH= peso postura/peso inicial de garrapatas) y eficiencia reproductiva (ER= IPH x % eclosión larvaria) (Bittencourt *et al.* 1994a; 1997). Los datos fueron sometidos a análisis de varianza y a la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre tratamientos y controles. En los ensayos con larvas en laboratorio se determinó la concentración letal media (LC₅₀) usando el programa Probit.

Resultados

Bioensayos en laboratorio. En todas las concentraciones utilizadas se observó esporulación del hongo *M. anisopliae* sobre las garrapatas tratadas siete días después de la inoculación. *M. anisopliae* causó disminución en el IPH y en la ER de las garrapatas cuando se aplicó cualquier cepa y en todas las concentraciones usadas, con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control (Tabla 1). La cepa 137bm causó la más alta IPH llegando a ser entre las dosis 1×10^6 y 1×10^9 conidias/ml de hasta 22 veces menor que en el control. Además, mientras que el valor de ER en el grupo control fue cercano al 50%, en el grupo tratado con la cepa 137bm en las dosis 1×10^8 y 1×10^9 conidias/ml, estuvo por debajo del 0,1% (Tabla 1). La eclosión larvaria a partir de huevos que procedían de las garrapatas tratadas también disminuyó con la aplicación de todas las cepas y dosis, pero, particularmente con la cepa 137bm con la que la eclosión de larvas fue de 1,67% y 0,5% en las dosis 1×10^8 y 1×10^9 conidias/ml respectivamente, mientras que en el grupo control el porcentaje de eclosión fue del 97,5% (Tabla 2).

En los bioensayos con larvas de garrapata se encontró una alta susceptibilidad de las larvas a todas las cepas de *M. anisopliae* y se determinó que las cepas 81, 94, 95 y 136 fueron

Tabla 1. Eficacia de *Metarhizium anisopliae* sobre la garrapata *Boophilus microplus*.

Dosis (conidias/ml)	Índice de producción de huevos (IPH)						
	Cepas						
	77	81	94	95	115	136	137bm
Control	0,51 ^a	0,51a	0,51a	0,51a	0,51a	0,51a	0,51a
1x10 ³	n.d.	n.d.	0,36bc	n.d.	n.d.	0,41ab	0,43ab
1x10 ⁴	n.d.	n.d.	0,32bcd	n.d.	n.d.	0,34bcd	0,39bc
1x10 ⁵	n.d.	n.d.	0,29bcd	n.d.	n.d.	0,28cd	0,32c
1x10 ⁶	0,33b	0,41ab	0,43ab	0,37b	0,38b	0,38bc	0,34c
1x10 ⁷	0,33b	0,37bc	0,28cd	0,37b	0,41ab	0,25de	0,20d
1x10 ⁸	0,31b	0,33bc	0,20de	0,22c	0,27b	0,10f	0,05e
1x10 ⁹	0,33b	0,24c	0,09d	0,13c	0,32b	0,13ef	0,02e
Control	Eficacia reproductiva (ER) (%)						
	49,54a	49,54a	49,54a	49,54a	49,54a	49,54a	49,54a
	n.d.	n.d.	34,82bc	n.d.	n.d.	38,57b	39,98b
	n.d.	n.d.	30,36bcd	n.d.	n.d.	32,66bcd	33,39bc
	n.d.	n.d.	27,44cd	n.d.	n.d.	25,52cd	24,80c
	27,40b	26,83b	40,64ab	35,85b	30,78bc	34,97bc	25,74c
	25,57b	22,02bc	21,96de	30,00b	35,35b	22,08d	10,65d
	26,44b	15,15bc	13,29e	13,87c	20,21c	2,36e	0,09e
	25,49b	11,32c	1,50f	6,46c	18,92c	6,04e	0,01e

^a Los datos dentro de una columna y para cada índice seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey $\alpha = 0.05$). n.d. = no determinado.

las más efectivas para matar larvas de garrapata y presentaron una concentración letal media (CL₅₀) en un rango entre 1,57x10⁴ y 6,33x10⁴ conidias/ml (Tabla 3).

Ensayos en campo. Los datos de la semana uno corresponden a la población natural de garrapatas teleoginas o larvas de garrapata en las vacas o en el pasto, respectivamente. Después de las aplicaciones de *M. anisopliae* cepa 137bm se ob-

servó una disminución del 75% en la infestación de garrapatas en los animales del grupo tratado, con diferencias estadísticamente significativas, entre los datos, a partir de la tercera semana (después de dos aplicaciones) y del inicio del experimento (Tabla 4).

En el grupo de vacas control se presentó un aumento en la infestación de garrapatas durante el mismo periodo (Tabla 5). Además, la cepa 137bm *M. anisopliae* causó una disminución

Tabla 2. Porcentaje de eclosión de larvas de huevos procedentes de *Boophilus microplus* tratadas con diferentes cepas y dosis de *Metarhizium anisopliae*.

Dosis (conidias/mL)	Índice de producción de huevos (IPH)						
	Cepas						
	77	81	94	95	115	136	137bm
Control	97,55 ^a	97,55a	97,55a	97,55a	97,55a	97,55a	97,55a
1x10 ³	n.d.	n.d.	96,67ab	n.d.	n.d.	93,5a	93,17ab
1x10 ⁴	n.d.	n.d.	95,67ab	n.d.	n.d.	94,67a	84,5bc
1x10 ⁵	n.d.	n.d.	93,67ab	n.d.	n.d.	92,83a	78c
1x10 ⁶	82,67ab	65,33b	95ab	95,67a	81,33cb	91,17a	76,67c
1x10 ⁷	75b	60,33b	77,5b	80ab	86,67b	88,17a	51,33d
1x10 ⁸	82,67ab	46c	45,67c	62bc	74c	21,5b	1,67d
1x10 ⁹	78,33b	48,67c	14,67d	43,33c	60,33d	41,5b	0,5e

^a Los datos dentro de una columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey $\alpha = 0,05$). n.d. = no determinado.

Tabla 3. Concentración letal media (CL₅₀) de diferentes cepas de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de garrapatas *Boophilus microplus*.

Cepas	CL ₅₀ (conidias/ml)	Inferior	superior
77	5.84x10 ⁶	5.96x10 ⁴	5.71x10 ⁸
81	1.57x10 ⁴	1.09x10 ⁴	2.20x10 ⁴
94	2.85x10 ⁴	1.65x10 ⁴	4.65x10 ⁴
95	4.12x10 ⁴	8.43x10 ³	1.97x10 ⁵
115	1.24x10 ⁵	9.99x10 ⁴	1.55x10 ⁶
136	6.33x10 ⁴	1.94x10 ³	2.03x10 ⁶
137bm	1.97x10 ⁶	2.54x10 ⁵	1.54x10 ⁷

de oviposición y eclosión de larvas provenientes de vacas tratadas por lo que los valores de IPH y ER son de tres y dos veces menores que en el control, con diferencias estadísticamente significativas, después de la segunda y tercera aplicación del hongo, respectivamente (Tabla 5).

En el experimento en pasto el efecto biocontrolador de *M. anisopliae* fue menos notorio debido a que tanto en la parcela tratada como en el control hubo una disminución en la población de larvas garrapata durante el tiempo de evaluación. De manera que en la segunda semana del experimento en pasto, después de la primera aspersión con las conidias de *M. anisopliae*, se encontró una reducción del 87% de la población de larvas de garrapata (Tabla 4). Mientras que en el control solo se presentaron diferencias significativas respecto al recuento inicial, hasta cuatro semanas después de haber iniciado el experimento (Tabla 4).

Discusión

M. anisopliae presentó una alta capacidad para atacar las garrapatas, puesto que aun en las concentraciones más bajas utilizadas afectó diferentes estados de desarrollo de este ectoparásito sobre los bovinos o en el pasto. Además, *M. anisopliae* causó disminución en la oviposición de garrapatas provenientes de vacas tratadas y en la eclosión larvaria, lo que podría ser interpretado como la transmisión vertical del efecto controlador del hongo a la descendencia del artrópodo. Resultados similares han sido demostrados en otros estudios de control de garrapatas (Bittencourt *et al.* 1994a, 1994b; Barcelos *et al.* 1998; Bittencourt 2000; Kaaya 2000; Guedes *et al.* 2000; Quesada-Moraga *et al.* 2004). El efecto de transmisión vertical de *M. anisopliae* ha sido estudiado en cucarachas, en las que se encontró disminución cercana al 50% en la producción de

Tabla 4. Promedio de garrapatas teleoginas (tamaño 4 a 8 mm) en las vacas y de larvas de garrapatas en el pasto con *Metarhizium anisopliae* cepa 137bm.

Semana ^a	Garrapatas / vaca		Larvas de garrapata/m ²	
	<i>M. anisopliae</i>	Control	<i>M. anisopliae</i>	Control
1	103a ^b	36b	53a	68a
2	107a	66ab	7b	57ab
3	45ab	63ab	3b	21ab
4	32b	59ab	0b	17b
5	26b	57ab	1b	23abc
6	70ab	86a	0b	6c

^a Las aplicaciones se hicieron en las semanas 1,2 y 3 ^b = Los datos dentro de una columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey α = 0,05).

huevos y en la eclosión de ninfas cuando los adultos fueron tratados con la cepa EAMa01/121-Su (Quesada-Moraga *et al.* 2004).

Los resultados de laboratorio pudieron ser extrapolados a la prueba de campo que se realizó con la cepa 137bm, aunque los cambios en los resultados de IPH, ER y eclosión no tuvieron la misma intensidad de los ensayos de laboratorio posiblemente debido a que las conidias del hongo se vieron afectadas por condiciones ambientales como la intensidad solar y la lluvia.

M. anisopliae causó una disminución en la infestación de garrapatas en el ganado y en el pasto. Este efecto controlador de *M. anisopliae* sobre las garrapatas se conservó en el ganado tratado durante dos semanas después de la última aplicación. Resultados similares fueron observados en un trabajo previo donde el efecto de las conidias de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* persistieron entre una a tres semanas en las orejas del ganado después de la aplicación (Kaaya *et al.* 1996).

De acuerdo con los datos de IPH, ER y el porcentaje de eclosión larvaria, no se presentaron diferencias significativas entre el grupo de vacas tratadas y el control cuando se aplicó *M. anisopliae* la primera vez, pero después de la segunda y de la tercera aplicación del hongo sobre las vacas se encontró reducción de los parámetros en el grupo de animales tratados, situación que sugiere que una sola aplicación no es lo suficientemente efectiva, por lo que se deben realizar aplicaciones periódicas de hongos en un esquema similar al que se hace cuando se aplican productos químicos. Además, la aplicación de *M. anisopliae* también debe realizarse en el pasto donde se encuentran las larvas de garrapatas con el fin de disminuir la posibilidad de una nueva infestación en el ganado, ya que se

Tabla 5. Parámetros para medir el efecto de *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus* colectadas de ganado tratado en las pruebas de campo.

Tratamiento	Aplicación 1 ^a			Aplicación 2			Aplicación 3		
	IPH ^b	ER ^c (%)	Eclosión (%)	IPH	ER (%)	Eclosión (%)	IPH	ER (%)	Eclosión (%)
<i>M. anisopliae</i>	0,21a ^d	12,75a	52,63a	0,12b	9,71b	24,84b	0,14b	9,68b	36,20b
Control	0,25a	21,31a	46,89a	0,36a	32,14a	80,83a	0,26a	24a	72,52a

^a Las aplicaciones se hicieron en las semanas 1, 2 y 3. ^b Índice de producción de huevos (IPH). ^c Eficiencia reproductivas (ER). ^d Los datos dentro de una columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey α = 0,05).

conoce que las larvas son altamente susceptibles a la acción del hongo, como se logró comprobar en este trabajo.

A pesar de que en el experimento de campo en la parcela control hubo disminución en la población de garrapatas, ésta sólo presentó diferencias significativas respecto a la población inicial de larvas a partir de la cuarta semana del experimento mientras que en el lote tratado la disminución se dio una semana después. Además, el experimento de campo fue realizado durante octubre y noviembre de 2003 que estuvieron entre los meses más lluviosos del año con 202 y 156 mm, y 21 y 14 días de lluvia en el mes, respectivamente (Datos obtenidos del Instituto de Estudios Ambientales de Colombia IDEAM). Esta precipitación puede tener dos efectos, el primero es mantener una alta humedad en el ambiente lo que favorece la germinación de las conidias de *M. anisopliae* y promueve el proceso de infección (Luz y Fargues 1997), pero por otro lado puede causar disminución de la población de larvas del pasto por lavado, tendencia que se observó en el grupo control.

Agradecimientos

Este proyecto se desarrolló con el apoyo financiero de Colciencias, Corporación para Investigaciones Biológicas y la Empresa Colombiana de Productos Veterinarios, Vecol S.A.

Literatura citada

- BARCELOS, A.; FIORIN, A.; MONTEIRO, A.; VERÍSSIMO, C. 1998. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. *Journal of Invertebrate Pathology* 71 (2): 189-191.
- BENJAMÍN, M.; ZHIOUA, E.; OSTFELD, R. 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.
- BITTENCOURT, V. 2000. Trials to control south american ticks with entomopathogenic fungi. *Annals of the New York Academy of Sciences* 916: 555-558.
- BITTENCOURT, V.; MASSARD, C.; LIMA, A. 1994a. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitaria do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. *Revista Universidad Rural. Série Ciências da Vida* 16 (1-2): 49-55.
- BITTENCOURT, V.; MASSARD, C.; LIMA, A. 1994b. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvo do garrapato *Boophilus microplus*. *Revista Universidad Rural. Série Ciências da Vida* 16 (1-2): 41-47.
- BITTENCOURT, V.; SOUZA, E.; PERALVA, S.; MASCARENHAS, A.; ALVES, S. 1997. Avaliação da eficácia *in vitro* de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 6 (1): 49-52.
- CHAGAS, A.; LEITE, R.; FURLONG, J.; PRATES, H.; PASSOS, W. 2003. Susceptibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. *Ciencia Rural* 33 (1): 109-114.
- DA COSTA, G.; SARQUIS, M.; DE MORAES, A.; BITTENCOURT, V. 2002. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887); in Rio de Janeiro State; Brazil. *Mycopathologia* 154 (4): 207-209.
- GINDIN, G.; SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.; GLAZER, I. 2000. The susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) ticks to entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology* 11 (1): 111-118.
- GUEDES, A.; DA SILVA, I.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; HENNING, M. 2000. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* 94 (1-2): 117-125.
- HASSANAIN, M.; EL-GARBY, M.; ABDEL-GHAFFAR, F.; EL-SHARABY, A.; ABDEL MEGEED, K. 1997. Biological control studies of soft and hard Ticks in Egypt. I The effect of *Bacillus thuringiensis* varieties of soft and hard tick (Ixodidae). *Parasitology Research* 83 (3): 209-213.
- HILL, E. 1998. Entomopathogenic nematodes as control agents of developmental stages of the black legged tick: *Ixodes scapularis*. *Journal of Parasitology* 84(6): 1124-1127.
- JONSSON, N.; MATSCHOSS, A.; PEPPER, P.; GREEN, P.; ALBRECHT, M.; HUNGERFORD, J.; ANSELL, J. 2000. Evaluation of TickGARD^{PLUS}, a novel vaccine against *Boophilus microplus*; in lactating Holstein-Friesian cows. *Veterinary Parasitology* 88 (3-4): 275-285.
- KAAYA, G. 2000. Laboratory and field evaluation for entomogenous fungi for tick control. *Annals of the New York Academy of Sciences* 916: 559-564.
- KAAYA, G.; ASAN, S. 2000. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Experimental and Applied Acarology* 24 (12): 913-926.
- KAAYA, G.; MWANGI, E.; OUNA, E. 1996. Prospects for biological control of livestock ticks; *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*; using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 67 (1): 15-20.
- LÓPEZ, E.; ORDUZ, S. 2003. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control nests of the fungus-growing ant; *Atta cephalotes*. *Biological Control* 27 (2): 194-200.
- LUZ, C.; FARGUES, J. 1997. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*; pathogenic to *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia* 138 (3): 117-125.
- PRATES, H.; LEITE BR.; CRAVEIRO CA.; OLIVEIRA DA. 1998. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 9 (2): 193-197.
- QUESADA-MORAGA, E.; SANTOS-QUIROS, R.; VALVERDE-GARCIA, P.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. 2004. Virulence; horizontal transmission; and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 87 (1): 51-58.
- RODRÍGUEZ-VIVAS, R.; RODRIGUEZ-AREVALO F.; ALONSO-DIAZ M.; FRAGOSO-SANCHEZ H.; SANTAMARIA V.; ROSARIO-CRUZ R. 2006. Prevalence and potential risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms in the State of Yucatan, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine* 75 (3-4): 280-286.
- RUIZ, L.; ORDUZ, S.; LÓPEZ, E.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M.; ARMENGOL, G. 2007. Immune response in mice and cattle after immunization with a *Boophilus microplus* DNA vaccine containing *bm86* gene. *Veterinary Parasitology* 144 (1-2): 138-145.
- SOUZA, E.; REIS, R.; BITTENCOURT, V. 1999. Evaluation of in vitro effect of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on eggs and larvae of *Amblyomma cajennense*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 8 (2): 127-131.
- ZHIOUA, E.; BROWING, M.; JOHNSON, P.; GINSBERG, H.; LIEBRUN, R. 1997. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuterocycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitology* 83 (5): 815-818.