

# Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revisión

## Control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) using the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Review

Melina Maribel Ojeda-Chi<sup>a</sup>, Roger Ivan Rodríguez-Vivas<sup>a</sup>, Edelmira Galindo-Velasco<sup>b</sup>, Roberto Lezama-Gutiérrez<sup>b</sup>, Carlos Cruz-Vázquez<sup>c</sup>

### RESUMEN

Las infestaciones de la garrapata del ganado, *Rhipicephalus microplus*, producen el mayor problema global de ectoparásitos en ganado de regiones tropicales y subtropicales, provocan importantes pérdidas económicas en la producción de carne, leche y pieles; además incrementan los gastos derivados de los programas de control, y son capaces de transmitir *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale*. El control de *R. microplus* se basa principalmente en el uso de ixodicidas; sin embargo, su uso irracional ha propiciado la aparición de garrapatas resistentes a las principales familias de ixodicidas, siendo necesario desarrollar alternativas de control no químico. Una de estas alternativas es el uso de hongos entomopatógenos, entre los que se encuentra *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) el cual ha demostrado ser eficiente, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, para el control de las diferentes fases evolutivas de *R. microplus*; causa disminución en la tasa de oviposición, incrementa el periodo de incubación y de eclosión, además produce la muerte de larvas y garrapatas adultas con porcentajes de eficiencia de hasta el 100 %. Diferentes estudios demuestran que *M. anisopliae* representa una alternativa no química sustentable para el control de garrapatas. La presente revisión tiene como objetivo presentar información actualizada sobre el uso de diferentes cepas de *M. anisopliae* en el control de la garrapata *R. microplus*.

**PALABRAS CLAVE:** *Metarhizium anisopliae*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Control biológico, Hongos.

### ABSTRACT

Infestations with cattle tick, *Rhipicephalus microplus* constitute the most important ectoparasite problem in the tropical and subtropical regions of the globe, resulting in major economic losses in the production of beef, milk, and leathers, in addition of increasing the cost of control programs transmitting *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. The control of *R. microplus* is mostly based on the use of ixodicides. Nevertheless, the irrational use of such products has resulted in tick populations exhibiting resistance to all major ixodicide drug classes. This has urged the development of non-chemical control alternatives, including the use of entomopathogenic fungi, among which *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) has shown to be efficient both *in vitro* and *in vivo* for the control of the different evolution stages of *R. microplus*. The use of these fungi results in decreased oviposition, increased incubation/hatch times, and death of tick larval and adult stages, with efficiency rates of up to 100 %. Several studies show that *M. anisopliae* is a sustainable non-chemical alternative for the control of ticks. The purpose of this paper is to present an updated review on the use of different *M. anisopliae* strains for the control of *R. microplus*.

**KEY WORDS:** *Metarhizium anisopliae*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Biological control, Fungi.

Recibido el 19 de enero de 2010. Aceptado el 10 de mayo de 2010.

<sup>a</sup> Departamento de Parasitología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Km. 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil. 97100 Mérida, Yucatán, México. [rvivas@uady.mx](mailto:rvivas@uady.mx). Correspondencia al segundo autor.

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima.

<sup>c</sup> Instituto Tecnológico El Llano, Aguascalientes.

## INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus microplus* produce el mayor problema global de ectoparasitosis en la ganadería bovina de las regiones tropicales y subtropicales. El impacto económico se debe al daño a las pieles por acción de las picaduras, pérdida de sangre, efectos tóxicos, reducción en la producción de leche, en la producción de becerros y el incremento en los costos de control; además de los agentes etiológicos que transmiten como: virus, bacterias, rickettsias y protozoos<sup>(1)</sup>.

Los métodos de control de las garrapatas se clasifican en químicos y no químicos. El método de control de *R. microplus* más utilizado es el uso de ixodicidas, entre los que se encuentran las familias de los organofosforados (OF), piretroides sintéticos (PS), amidinas (Am), fenilpirazolonas (FP) y lactonas macrocíclicas (LM)<sup>(2,3)</sup>. Sin embargo, con el tiempo, el uso irracional de estos compuestos han generado resistencia; además existe la creciente demanda del consumidor por preferir alimentos libres de químicos. La concientización de los efectos negativos de los ixodicidas en el ambiente<sup>(4)</sup>, ha motivado la búsqueda de métodos alternativos de control no químico, en donde se incluye la selección de razas de bovinos resistentes, vacunas antigarrapatas, y control biológico, entre otros<sup>(1)</sup>. Diferentes organismos vivos como las hormigas, bacterias, nematodos y hongos entomopatógenos, han demostrado ser eficaces en el control de ectoparásitos de importancia veterinaria<sup>(5)</sup>.

Por su distribución cosmopolita y alta patogenicidad, el hongo *Metarhizium anisopliae* Metch.) Sor. (Hypocreales: Clavicipitaceae) ha demostrado ser uno de los hongos entomopatógenos más eficientes para la bio-regulación de *R. microplus* en condiciones *in vitro* e *in vivo*<sup>(5-10)</sup>.

La presente revisión tiene como objetivo presentar información actualizada sobre el uso de diferentes cepas de *M. anisopliae* en el control de la garrapata *R. microplus*.

## RHIPICEPHALUS MICROPLUS

### a) Generalidades

Las garrapatas son ácaros artrópodos, comprendidas en dos familias: Ixodidae o garrapatas duras y

## INTRODUCTION

Cattle tick *Rhipicephalus microplus* causes world's greatest ectoparasite problem in tropical and subtropical regions. Major economic losses result from damaged (bitten) skins, blood loss, toxicity, decreased milk yield, lesser calves, and increased control costs. In addition, *R. microplus* is vector of other pathogens including viruses, bacteria, rickettsiae and protozoa<sup>(1)</sup>.

Tick control methods can be categorized as either chemical or non-chemical. The most popular control method for *R. microplus* is the use of ixodicides. These pesticides include the organophosphate (OP), synthetic pyrethroid (SP), amidine (Am), phenylpyrazolone (PP) and macrocyclic lactone (ML) classes<sup>(2,3)</sup>. Nevertheless, the long, irrational use of these chemicals for the control of ticks has resulted in resistance. In addition, increased consumer demand exists for drug-free foods. Awareness on the negative effects of ixodicides on the environment<sup>(4)</sup>, has promoted the search of alternative, non-chemical control methods including the genetic selection of resistant cattle breeds, anti-tick vaccines, biological control methods, etc<sup>(1)</sup>. Different live organisms including ants, bacteria, nematodes, and entomopathogenic fungi have shown to be efficacious in the control of ectoparasites of veterinary relevance<sup>(5)</sup>.

Due to its ubiquitous distribution and high pathogenicity, the fungus *Metarhizium anisopliae* Metsch.) Sor. (Hypocreales: Clavicipitaceae) has shown to be one of the most efficient entomopathogenic fungi in the bioregulation of *R. microplus* both *in vitro* and *in vivo*<sup>(5-10)</sup>.

The purpose of this paper is to present an updated review on the use of different *M. anisopliae* strains for the control of *R. microplus*.

## RHIPICEPHALUS MICROPLUS

### a) Overview

Ticks are arthropod mites included in two families: *Ixodidae* (hard ticks), and *Argasidae* (soft ticks). In total, 899 tick species have been identified and

Argasidae o garrapatas blandas. Se reporta la existencia de un total de 899 especies que integran la lista de garrapatas identificadas a nivel mundial. En la familia *Ixodidae* se incluyen 713 especies, en el género *Ixodes* se enlistan 249, *Amblyomma* 14, *Anomalohimalaya* 3, *Bothriocroton* 5, *Cosmiomma* 1, *Dermacentor* 36, *Haemaphysalis* 166, *Hyalomma* 25, *Margaropus* 3, *Nosomma* 1, *Rhipicentor* 2 y *Rhipicephalus* 79<sup>(11)</sup>.

Debido a su gran capacidad de adaptación y propagación las garrapatas del género *Boophilus* se han podido extender en diversas áreas geográficas de todo el mundo, con diferencias significativas en su comportamiento biológico<sup>(12)</sup>, y recientemente han sido reclasificadas dentro del género *Rhipicephalus* de acuerdo a su filogenia<sup>(13)</sup>, por tal motivo en la presente revisión se referirá a esta garrapata como *Rhipicephalus microplus*.

De las cinco especies que integran a nivel mundial el género *Rhipicephalus microplus* presenta mayor importancia por su amplia distribución, que incluye a gran parte de América, África, Asia y Australia, excepto Estados Unidos de América donde se encuentra erradicada<sup>(14,15)</sup>. *R. microplus* es la garrapata de mayor frecuencia e importancia en la industria ganadera<sup>(1)</sup>.

#### b) Importancia económica

Entre los efectos más importantes que producen las garrapatas al ganado bovino se encuentra la disminución en el consumo de alimento, pérdida de peso, anemias producidas por pérdida de sangre, irritación por picaduras y depreciación de las pieles afectadas. Al lesionar la piel, pueden transmitir diversos agentes patógenos como virus, bacterias, rickettsias y protozoos. Esto puede conducir a enfermedades agudas, crónicas o incluso, a la muerte de los animales. La pérdida de peso de un bovino parasitado por garrapatas del género *Rhipicephalus* se calcula en 0.26 kg/garrapata/año, lo que representa pérdidas de varios miles de millones de dólares en la economía pecuaria mundial<sup>(1)</sup>. Jonsson<sup>(16)</sup> encuentra que animales infestados con garrapatas, reducían su consumo de alimento (4.37 kg) en comparación con animales no expuestos a garrapatas (5.66 kg); además reporta

listed in the world literature. The *Ixodidae* family includes 713 species. Genera in this family are as follows: *Ixodes* 249, *Amblyomma* 14, *Anomalohimalaya* 3, *Bothriocroton* 5, *Cosmiomma* 1, *Dermacentor* 36, *Haemaphysalis* 166, *Hyalomma* 25, *Margaropus* 3, *Nosomma* 1, *Rhipicentor* 2, and *Rhipicephalus* 79<sup>(11)</sup>.

Due to their remarkable ability to adapt and propagate, ticks in the *Boophilus* genus have invaded different geographic areas throughout the world, showing significant differences in their biological behavior<sup>(12)</sup>. Multiple ticks formerly in the *Boophilus* genus have been recently re-classified within the *Rhipicephalus* genus, in agreement with their phylogenetic features<sup>(13)</sup>. Therefore, the tick targeted in this particular review will hereinafter be referred to as *Rhipicephalus microplus*.

Out of the five species recognized worldwide as members of the *Rhipicephalus* genus, *R. microplus* is particularly important due to its broad distribution including parts of the Americas (except the US, where the tick has been eradicated), Africa, Asia and Australia<sup>(14,15)</sup>. *R. microplus* is the most frequent, most important tick affecting the cattle industry<sup>(1)</sup>.

#### b) Economic importance

Among the most important effects of ticks on cattle, decreased feed intake, weight loss, anemia caused by blood loss, bite irritation, and leather downgrading outstand. By causing skin lesions, ticks can act as vectors of different pathogens including viruses, bacteria, rickettsiae and protozoa, which can eventually result in acute or chronic diseases, and even death. Weight loss of individual cattle parasitized by *Rhipicephalus* has been estimated in 0.26 kg/tick/year. This represents losses for several million dollars in animal agriculture worldwide<sup>(1)</sup>. Jonsson<sup>(16)</sup> found that tick-infested cattle showed decreased feed intake (4.37 kg) as compared to that in cattle not exposed to ticks (5.66 kg), in addition of reducing several metabolites, cell types, and enzymes including hemoglobin, white blood cells, cholesterol, albumin, globulin, amylase, alkaline phosphatase, etc. Furthermore, ticks can potentially secrete hepatotoxic compounds.

alteraciones en varios metabolitos entre los que se encontraban la hemoglobina, glóbulos blancos, colesterol, albúmina, globulina, amilasa, fosfatasa alcalina y también es posible que secreten compuestos hepatotóxicos.

### c) *Métodos para el control*

#### *Químico*

Los químicos disponibles, que se utilizan para el tratamiento de ectoparásitos de importancia en medicina veterinaria, son sistémicos, todos los ixodicidas son neurotóxicos, y ejercen su efecto sobre el sistema nervioso de los ectoparásitos<sup>(18)</sup>. Los métodos tradicionales del tratamiento ixodicida, para el control de garrapatas requieren de formulaciones que se diluyan en agua y se apliquen por aspersión o inmersión en los animales. Además se incluyen los métodos de derrame (pour-on), inyectables, bolos intraruminales, aretes impregnados con ixodicidas y feromonas<sup>(19)</sup>.

Entre los principales ixodicidas que se utilizan para el control de garrapatas se encuentran los organoclorados (OCs), OFs, PSs, Am, fenilpirazoles, reguladores del crecimiento y los endectocidas denominadas lactonas macrocíclicas (LM)<sup>(19,20,21)</sup>. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ha provocado la selección de poblaciones de garrapatas resistentes, debido a la fuerte presión que elimina a los individuos susceptibles, por lo que se disminuye progresivamente el efecto y se elevan los costos de desarrollo de nuevos ixodicidas. La resistencia mundial a los acaricidas se encuentra bien documentada<sup>(22,23)</sup>.

En el sureste de México Rodríguez-Vivas *et al*<sup>(3,22,23)</sup> estudiaron poblaciones de campo de *R. microplus* y encuentran que la mayoría de los ranchos estudiados presentaban poblaciones de garrapatas con resistencia múltiple a ixodicidas (principalmente multiresistencia a OFs-PSs-Am). La resistencia a los PSs fue la más importante, ya que del 66 al 95 % de los ranchos en el sureste de México presentan garrapatas con resistencia a deltametrina, flumetrina y cipermetrina. Recientemente<sup>(24,25)</sup> se han reportado en México los primeros casos de *R. microplus* resistente a

### c) *Control methods*

#### *Chemical control*

Drugs available for the treatment of ectoparasites with veterinary importance work systemically. All ixodicides are neurotoxic, exerting their effects on the nervous system of ectoparasites<sup>(18)</sup> Traditional tick control treatments are based on water-soluble ixodicide formulations to be applied by spray or immersion. Other administration methods are also used including pour-on, injection, intra-ruminal bolus, and ixodicide-/pheromone-impregnated ear tags<sup>(19)</sup>.

Major ixodicide classes used for tick control include organochlorinated drugs (OCs), OPs, SPs, Am, PPs, growth regulators, and the endectocides known as MLs<sup>(19,20,21)</sup>. Even though, the indiscriminate use of these products has resulted in the selection of resistant tick populations due to the strong pressure that kills susceptible individuals, so that the effect of these chemical drugs is gradually lost. In addition, the development of new ixodicides is extremely expensive. Worldwide resistance of ticks to acaricides is well documented<sup>(22,23)</sup>.

In Southeast Mexico, Rodríguez-Vivas *et al*<sup>(3,22,23)</sup> studied field populations of *R. microplus* and found that most cattle ranches studied had tick populations with multiple ixodicide resistance (particularly to OPs, SPs, and Am). The most important resistance was that to SPs, since 66 to 95 % of the cattle operations studied in that region showed ticks resistant to deltamethrin, flumethrin and cypermethrin. The first Mexican cases of *R. microplus* resistant to fipronil<sup>(24)</sup> and ivermectin<sup>(25)</sup> have been reported recently, which emphasizes the need of searching new control alternatives in order to reduce the use of ixodicides thus delay the selection process of drug-resistant tick populations.

#### *Non-chemical control*

Non-chemical control methods are based on the use of animal husbandry practices such as selecting tick-resistant cattle breeds, grassland management, vaccination, biological control, etc.

#### *Biological control*

Biological control is defined as the rational use of live organisms aiming to reduce the populations of

fipronil e ivermectina respectivamente, lo que pone de manifiesto la necesidad de buscar nuevas alternativas de control, para reducir el uso de ixodicidas y retrasar el proceso de selección de poblaciones de garrapatas resistentes a los productos químicos.

#### *No químico*

Los métodos de control no químico se basan en el uso de prácticas zootécnicas como el de razas de bovinos resistentes, el manejo de pastizales, uso de vacunas y control biológico, entre otras.

*Control biológico.* El control biológico se define como el uso consciente de organismos vivos para reducir las poblaciones de organismos plaga o patógenos. Se consideran agentes de biocontrol a depredadores, parásitos, patógenos, competidores de las plagas, feromonas naturales y plantas resistentes. El uso de control biológico se va incrementando debido a que ha aumentado la conciencia sobre la seguridad medioambiental y salud humana, pero además, debido al incremento del costo del control químico y al aumento de la resistencia de las garrapatas a los ixodicidas<sup>(5)</sup>.

Los agentes biológicos que potencialmente pueden ser usados para el control de garrapatas incluye a los hongos entomopatógenos (p.ej. *Metarhizium* sp., *Cordyceps bassiana* (= *Beauveria bassiana*), *Isaria fumosarosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*), las bacterias (*Bacillus thuringiensis*, *Cedecea lapagei*, *Escherichia coli* y *Enterobacter agglomerans*)<sup>(26,27)</sup>, especies de nematodos (*Heterorhabditis* spp. y *Steinernema* spp.) y hormigas (*Solenopsis germinata*, *S. saevissima*, *Camponotus rengira* y *Ectatomma quadridens*).

*Hongos entomopatógenos.* Los hongos entomopatógenos poseen extrema importancia en el control de ectoparásitos; virtualmente todos los ectoparásitos son susceptibles a las enfermedades fungosas y existen aproximadamente 700 especies de hongos entomopatógenos, de las cuales sólo el 10 % se usan para el control de insectos<sup>(5)</sup>. Dentro de los más importantes se mencionan *Metarhizium* spp, *Cordyceps* (= *Beauveria*) *bassiana*, *Aschersonia* spp, *Entomophthora* spp, *Zoophthora* spp, *Erynia* spp, *Eryniopsis* spp, *Akanthomyces* spp, *Fusarium*

pest/pathogenic organisms. Examples of biological control agents include predators, parasites, pathogens, pest competitors, natural pheromones, and resistant plants. The use of biological control is becoming more and more popular due to increased environmental safety/human health awareness, as well as due to the increased cost of chemical control measures, together with increased resistance of ticks to ixodicides<sup>(5)</sup>.

The biological agents that can potentially be used for the control of ticks include entomopathogenic fungi (i.e., *Metarhizium* sp., *Cordyceps bassiana* (= *Beauveria bassiana*), *Isaria fumosarosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*), bacteria (*Bacillus thuringiensis*, *Cedecea lapagei*, *Escherichia coli*, and *Enterobacter agglomerans*),<sup>(26,27)</sup> nematodes (*Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp.), and ants (*Solenopsis germinata*, *S. saevissima*, *Camponotus rengira*, and *Ectatomma quadridens*.)

*Entomopathogenic fungi.* Entomopathogenic fungi are extremely important in the control of ectoparasites, since virtually all of them are susceptible to fungal diseases. Nearly 700 species of entomopathogenic fungi have been described, and only 10 % of them are used for insect control<sup>(5)</sup>. The most important entomopathogenic fungi include *Metarhizium* spp, *Cordyceps* (= *Beauveria*) *bassiana*, *Aschersonia* spp, *Entomophthora* spp, *Zoophthora* spp, *Erynia* spp, *Eryniopsis* spp, *Akanthomyces* spp, *Fusarium* spp, *Hirsutella* spp, *Hymenostilbe* spp, *Isaria* (= *Paecilomyces*) *fumosarosea*, and *Verticillium* (= *Lecanicillium* spp), belonging to the Zygomycetes and Ascomycetes classes<sup>(28)</sup>. The fungi that have been evaluated for the control of *R. microplus* are *L. lecanii*, *C. bassiana* and *M. anisopliae*, which have shown potential efficacy in the control of various tick developmental stages (egg, larva, nymph, adult)<sup>(5,29-31)</sup>.

## METARHIZIUM ANISOPLIAE

### a) Overview

Up to a few years ago, the *Metarhizium* genus used to be taxonomically categorized as follows: class Hyphomycetes, family Moniliaceae, genus *Metarhizium*, specie *M. anisopliae*. This particular species is a truly entomopathogenic, anamorphous,

spp, *Hirsutella* spp, *Hymenostilbe* spp, *Isaria* (= *Paecilomyces*) *fumosorosea* y *Verticillium* (= *Lecanicillium* spp), pertenecientes a la clase Zygomycetes e Ascomycetes<sup>(28)</sup>. Los hongos que han sido evaluados para el control de *R. microplus* son *L. lecanii*, *C. bassiana* y *M. anisopliae*, los cuales han demostrado tener potencialidad para el control de distintas fases de desarrollo de la garrapata (huevo, larva, ninfa y adulto)<sup>(5,29-31)</sup>.

## METARHIZIUM ANISOPLIAE

### a) Generalidades

Hasta hace apenas unos años el género *Metarhizium* pertenecía taxonómicamente a la clase: Hyphomycetes, familia: Moniliaceae, género: *Metarhizium* y especie: *anisopliae*. Esta especie es un hongo entomopatógeno verdadero anamorfo y facultativo, aislado por primera vez en 1879 del escarabajo *Anisoplia austriaca* Herbst por Metchnikoff, quien sugiere su uso por primera vez como agente microbiano para el control de insectos<sup>(31)</sup>. Actualmente, se ha aislado de insectos, suelo, sedimentos del río y material orgánico en descomposición.

La clasificación taxonómica del género *Metarhizium* ha sufrido cambios de acuerdo a varios autores<sup>(32)</sup>. Tulloch<sup>(33)</sup> clasifica a las especies de este género, con base en sus características morfológicas y reconoce dos especies: *M. anisopliae* y *M. flavoviride*. Driver et al<sup>(34)</sup> mediante estudios moleculares reconocen en ambas especies de hongos, que existen cuatro variedades *M. anisopliae* var. *acridum*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* y *M. anisopliae* var. *majus*. Recientemente, se propone<sup>(32)</sup> la existencia de nueve especies: *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum* stat. nov., *M. lepidiotae* stat. nov., *M. majus* stat. nov., *M. globosum*, *M. robertsii* y *M. brunneum*. También los estudios filogenéticos han permitido reubicar a las especies de *Metarhizium* al grupo de los Ascomycetes (Hypocreales: Clavicipitaceae) parásitos de insectos, al considerar además el origen e implicaciones evolutivas como reproducción, hábitat, el uso de hospedero vivos y otros invertebrados como fuente de alimento<sup>(35,36,37)</sup>.

facultative fungus. It was first isolated in 1879 from the *Anisoplia austriaca* Herbst beetle by Metschnikoff, who first proposed its use as a microbial agent for the control of insects<sup>(31)</sup>. So far, it has been isolated from insects, soil, river sediments, and spoiled organic matter.

The taxonomic classification of the *Metarhizium* genus has recently been subjected to changes<sup>(32)</sup>. Tulloch<sup>(33)</sup> now classifies the different species of this genus based on their morphological features, and recognizes two species: *M. anisopliae* and *M. flavoviride*. Based on molecular studies, Driver et al<sup>(34)</sup> recognized that both fungus species include four varieties: *M. anisopliae* var. *acridum*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, and *M. anisopliae* var. *majus*. On the other hand, the existence of nine species has recently been proposed:<sup>(32)</sup> *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum* stat. nov., *M. lepidiotae* stat. nov., *M. majus* stat. nov., *M. globosum*, *M. robertsii*, and *M. brunneum*. Likewise, phylogenetic studies have led to relocating the various *Metarhizium* species within the insect-parasitizing Ascomycetes (Hypocreales: Clavicipitaceae) by also considering their origin and several evolution implications such as reproduction, habitat, the use of live hosts and other invertebrates as food sources<sup>(35,36,37)</sup>.

*M. anisopliae* attacks more than 200 species of insects and mites of different genera within the Orthoptera, Hemiptera, Lepidoptera, Dermaptera, Hymenoptera and Coleoptera classes, among others. In addition, *M. anisopliae* is known to have an effect on the following tick species: *Amblyomma americanum*, *A. maculatum*, *A. cajennense*, *A. variegatum*, *Rhipicephalus annulatus*, *R. microplus*, *Hyalomma excavatum*, *Ixodes scapularis*, *R. appendiculatus*, and *R. sanguineus*<sup>(30)</sup>.

*M. anisopliae* has the following abilities: growing as a saprophyte, spreading out by conidia, surviving in the soil, and exhibiting non-sexual reproduction<sup>(1,38)</sup>. The optimum temperature for the growth of *M. anisopliae* is 25 to 30 °C, with a relative humidity of 100 %<sup>(31)</sup>. The temperature extremes for *M. anisopliae* hyphal/conidial germination are

*M. anisopliae* ataca más de 200 especies de insectos y ácaros de diversos géneros, en los órdenes Orthoptera, Hemiptera, Lepidoptera, Dermaptera, Hymenoptera y Coleoptera, entre otros. Además, se sabe que *M. anisopliae* tiene efecto sobre las siguientes especies de garrapatas: *Amblyomma americanum*, *A. maculatum*, *A. cajennense*, *A. variegatum*, *Rhipicephalus annulatus*, *R. microplus*, *Hyalomma excavatum*, *Ixodes scapularis*, *R. appendiculatus* y *R. sanguineus*<sup>(30)</sup>.

*M. anisopliae* presenta la habilidad de crecer en forma saprófita, facilidad de diseminación de los conidios, capacidad de sobrevivencia en el suelo y reproducción asexual<sup>(1,38)</sup>. Requiere temperatura óptima de 25 a 30 °C y humedad relativa del 100 %<sup>(31)</sup>. Los límites térmicos para la germinación de los conidios y de las hifas de *M. anisopliae* se encuentran alrededor de 37 a 40 °C respectivamente<sup>(39)</sup>. A una humedad por debajo de 53 % se reduce la viabilidad de los conidios<sup>(6)</sup>.

#### b) Efecto entomopatógeno

El ciclo patogénico de *M. anisopliae* en *R. microplus* se divide en seis etapas que son: adhesión de esporas, penetración, invasión, colonización, muerte y emergencia de estructuras del hongo sobre la epicutícula:

**Adhesión de los conidios.** Los conidios se adhieren a la superficie del insecto 24 h después de la infección, iniciando el hongo el proceso patogénico<sup>(38,40)</sup>.

**Penetración.** La principal vía de penetración se lleva a cabo a través del tegumento. Una vez que los conidios se adhieren a la cutícula del artrópodo, germinan y forman tubos germinativos que invaden la cutícula, forman estructuras denominadas apresorios y penetran la superficie de la cutícula y en casos especiales, por el aparato bucal, orificio anal y genitales<sup>(40,41)</sup>; por medio de la combinación de procesos físicos y enzimáticos, *M. anisopliae* tiene la capacidad para sintetizar enzimas hidrolíticas tales como proteasas, lipasas, amilasas y quitinasas, proceso que ocurre 48 h postinfección. La primera barrera para la penetración es la epicutícula, blanco potencial para la acción de lipasas específicas

aproximadamente 37 and 40 °C, respectively<sup>(39)</sup>. Conidium livability is reduced in the face of < 53 % relative humidity<sup>(6)</sup>.

#### b) Entomopathogenic effect

The pathogenic cycle of *M. anisopliae* in *R. microplus* includes six different stages: spore adhesion, penetration, invasion, colonization, death, and emergence of fungus structures on the epicuticle.

**Conidium adhesion.** Conidia adhere to insect surface by 24 h after infection, then the fungus starts its pathogenic process<sup>(38,40)</sup>.

**Penetration.** The main penetration route is through the tegument. Once conidia adhere to the arthropod's cuticle, they germinate and form germinative tubes that invade the cuticle, forming structures called appressoria. Afterwards, they penetrate the cuticle surface. In special cases, penetration can also occur through the buccal apparatus, the anal orifice, and the genitals<sup>(40,41)</sup>. Using a combination of physical and enzyme processes, *M. anisopliae* has the ability of synthesizing hydrolytic enzymes such as proteases, lipases, amylases, and chitinases, a process that occurs by 48 h post-infection (p.i.) The first barrier for penetration is the epicuticle, a potential target for the action of specific lipases (*M. anisopliae* produced enzymes) related with free penetration and growth on the host's cuticle<sup>(42)</sup>. In addition, *M. anisopliae* possesses protein kinase A, which is important for the differentiation of appressoria, penetration, cuticle breakdown, nutrient acquisition, pH regulation, lipid synthesis, and control of both cell cycle and the cytoskeleton<sup>(43)</sup>.

**Invasion.** After 96 h p.i., hyphae colonize the host and emerge from the cuticle. Once inside the insect, the fungus spreads out via the hemolymph and produces blastospores and hyphal filamentous bodies that invade host's immune system and multiply rapidly in the tissues. In addition, the fungus produces two toxin classes: destruxins and cytolacins. Fourteen (14) toxins in the destruxin class have been identified, the most common ones being A, B, C, D, dies-methyl destruxin B, proto-destruxin. At least two cytolacins exist: A and D. The role of these toxins is inhibiting the

(enzimas producidas por *M. anisopliae*) relacionadas con la pre-penetración y crecimiento en la cutícula del hospedero<sup>(42)</sup>. Además posee la proteína quinasa A, importante para la diferenciación de las estructuras apesoras, penetración y degradación de la cutícula, adquisición de nutrientes, regulación de pH, síntesis de lípidos, control del ciclo celular y del citoesqueleto<sup>(43)</sup>.

**Invasión.** A las 96 h pos infección las hifas colonizan el huésped y emergen de la cutícula. Una vez dentro del insecto, el hongo se disemina vía hemolinfa y produce blastosporas y cuerpos filamentosos de hifas que invaden el sistema inmune del hospedero y se multiplican rápidamente en los tejidos. Además producen dos familias de toxinas que son las destruxinas y las citocalacinas. De la primera familia se han aislado 14 toxinas, de las cuales las más comunes son: A, B, C, D, diacetil-destruxina B y protodestruxina. En la segunda, se encuentra la citocalacina A y D. La función de estas toxinas es inhibir el sistema inmunológico del artrópodo, causando su muerte, además tiene efecto sobre la fecundidad y viabilidad de los huevos incubados<sup>(38,44,45)</sup>.

**Colonización.** La colonización del hongo en los órganos del artrópodo se produce en la siguiente secuencia: cuerpos grasos, sistema digestivo, tubos de malpigio, hipodermis, sistema nervioso, músculos y tráquea. Bittencourt *et al.*<sup>(41)</sup> mencionan que la penetración del hongo en los órganos ocurre al quinto día pos infección invadiendo también los órganos reproductivo y digestivo.

**Muerte.** Esta se debe a las micotoxinas, cambios patológicos en el hemocele, acción histolítica y bloqueo mecánico del aparato digestivo, secundario al crecimiento de las hifas<sup>(35)</sup>.

**Emergencia.** Se produce después de la muerte del insecto y cuando las condiciones de humedad relativa son adecuadas. La emergencia del micelio se realiza a través del tegumento, crece en la superficie y esporula después de 48 a 60 h de la muerte del hospedero<sup>(40,46)</sup>.

Se ha demostrado que *M. anisopliae* no causa efectos colaterales en los animales de sangre caliente

arthropod's immune system, which results in its death. In addition, toxins have effects on the fecundity and livability of incubating eggs<sup>(38,44,45)</sup>.

**Colonization.** Arthropod organ colonization by the fungus fulfills the following sequence: fatty bodies, digestive tract, Malpighian tubes, hypodermis, nervous system, muscles, and trachea. Bittencourt *et al.*<sup>(41)</sup> reported that organ penetration by the fungus occurs on day 5 p.i., and that the reproductive and digestive organs are also invaded.

**Death.** Death is caused by mycotoxins, pathological changes in the hemocele, histolytic action, and physical blocking of the digestive system, secondary to hyphal growth<sup>(35)</sup>.

**Emergence.** After insect death and in the face of adequate relative humidity, the fungus emerges. Mycelium emergence occurs through the tegument. The fungus then grows on the surface and sporulates by 48 to 60 h after host death<sup>(40,46)</sup>.

*M. anisopliae* has shown not to cause side effects on either warm blood animals or the environment<sup>(47)</sup>. Studies have shown that it is only toxic for insect cells, not affecting human cells, bacteria or protozoa<sup>(48)</sup>. On the other hand, Leyva *et al.*<sup>(49)</sup> reported that *M. anisopliae* Ma2 strain has no pathogenic, toxic, or allergic effects, and it does not cause appetite loss, diarrhea or death in *Wistar* rats. It is also worthy to mention that under field conditions *M. anisopliae* affects specifically its target host thus reducing the possibility of affecting other beings present in the field<sup>(50)</sup>. Rath *et al.*<sup>(35,51)</sup> reported that the application on the vegetation of *M. anisopliae* for the control of the underground beetle *Adoryphorus couloni* (Burmeister), does not have negative effects on other invertebrates. In addition, contrary to conventional acaricides, myco-acaricides do not affect the environment<sup>(28)</sup>.

### c) *In vitro/in vivo* effects

Table 1 lists *in vitro* results reported by different authors after the treatment of adult/instar stages of *R. microplus* with different fungal strains and concentrations. Virulence/pathogenicity variations are influenced by factors such as variations in the secretion of proteases and chitinolytic enzymes



Cuadro 1. Efecto *in vitro* de *M. anisopliae* para el control de *Rhipicephalus microplus*

Table 1. *In vitro* effect of *Metarhizium anisopliae* in the control of *Rhipicephalus microplus*

Author	Strain	Results
Lubeck <i>et al</i> <sup>(54)</sup>	E6, CArRO14, CGa47 & Cg97 at a dilution of 1x10 <sup>8</sup> spores / ml	90-100% mortality of adult ticks by 4 d post-infection. (p.i.)
Frazzon <i>et al</i> <sup>(7)</sup>	E6S1 at a dilution of 1x10 <sup>7</sup> spores/ml	50 & 100% mortality of adult ticks on d 5 & 14 p.i.
Polar <i>et al</i> <sup>(8)</sup>	ARSEF3297 at a 1x10 <sup>8</sup> dilution	100% mortality in larval and adult ticks from 6 d on, and oviposition decrease down to 12%.
Bahiense <i>et al</i> <sup>(45)</sup>	ESALQ959 combined with deltamethrin.	High larval mortality rates.
Ojeda-Chi <i>et al</i> <sup>(10)</sup>	Ma34, Ma14 strains and the Ma34+Ma14 combination at a dilution of 1x10 <sup>8</sup> spores/ml	Ma34 & Ma34+Ma14 with 100% efficacy in the control of adult ticks. 50 & 40% decreased oviposition. Ma14 with 62% efficacy on larvae. Ma34+Ma14 = 90%.
Fernández-Ruvalcaba <i>et al</i> <sup>(56)</sup>	ECS1 at the 1 x 10 <sup>8</sup> concentration	100% mortality of organophosphate-resistant or sensitive adult ticks by 20 d post-treatment.

ni al medio ambiente<sup>(47)</sup>; se han realizado estudios en los que se demuestra que sólo exhibe toxicidad en células de insectos, y no en células humanas, bacterias o protozoarios<sup>(48)</sup>. Por otro lado, Leyva *et al*<sup>(49)</sup> reportan que *M. anisopliae* cepa Ma2 no causa efecto de patogenicidad, toxicidad o alergia y no se observan pérdidas del apetito, diarrea, ni muerte en ratas cepa *Wistar*. También es importante mencionar que en condiciones de campo *M. anisopliae* afecta específicamente a sus huéspedes blanco, reduciendo la posibilidad de afectar a otros organismos presentes en el campo<sup>(50)</sup>. Rath *et al*<sup>(35,51)</sup> observaron que al aplicar *M. anisopliae* para el control del escarabajo subterráneo *Adoryphorus couloni* (Burmeister), en vegetación, no se presentan efectos negativos en los demás invertebrados presentes. Además los mico-acaricidas no afectan el medio ambiente como los acaricidas convencionales<sup>(28)</sup>.

### c) Efectos *in vitro* e *in vivo*

En el Cuadro 1 se muestra una relación de trabajos desarrollados por diversos autores, y los resultados reportados en pruebas *in vitro*, realizadas en garrapatas adultas y larvas de *R. microplus*, tratadas

during the infection process; the concentration used (the higher the concentration the higher the efficacy); developmental stage (some strains are more efficacious on adult ticks than on larval stages<sup>(26,46)</sup> other strains affect the nymph of *R. microplus*<sup>(28)</sup>, some strains cause decreased hatch, yet others affect oviposition<sup>(30,52)</sup>. It has also been reported that the place of origin of strains affects their tolerance to UV light. Bidochka *et al*<sup>(53)</sup> evaluated the genetic behavior of various strains and reported that strains isolated from agricultural soils are more tolerant to UV radiation than those from forestry soils.

Table 2 shows the results of *in vivo* studies using both natural and artificial infestations with adult ticks and larvae. In these studies carried out on animals, variations in strain efficacy levels can be directly related with climate factors, strain origin (some strains show higher tolerance to high temperature and UV light exposure)<sup>(52,53)</sup>, and the animal microenvironment (i.e., skin temperature). It has been demonstrated<sup>(30)</sup> that at temperatures exceeding 34 °C fungal germination starts to decrease.

As far as secretion chemical composition is concerned, it has been seen that tallow lipids impact

Cuadro 2. Efecto *in vivo* de *Metarhizium anisopliae* sobre *Rhipicephalus microplus*Table 2. *In vivo* effect of *Metarhizium anisopliae* on *Rhipicephalus microplus*

Author	Tick stage	Results
de Castro <i>et al</i> <sup>(61)</sup>	Adult ticks	The 959 strain with 50.2 & 53.5% efficacy at 10 <sup>7</sup> & 10 <sup>8</sup>
Polar <i>et al</i> <sup>(62)</sup>	Adult ticks	72 & 36% efficacy using the IMI386697 & ARSEF3297 strains at 1x10 <sup>8</sup> .
Alonso-Díaz <i>et al</i> <sup>(9)</sup>	Natural infestations	40-90% effectiveness at 1x10 <sup>8</sup> on adult ticks with Ma34.
Correia <i>et al</i> <sup>(63)</sup>	Adult ticks in dairies	No difference between treated and control groups, but ticks collected showed fungal growth
Bittencourt <i>et al</i> <sup>(59)</sup>	Artificial larval infestations	Three applications 15 d apart were given: 12-16% & 18-24% efficacy with ESALQ strain at 1x10 <sup>7</sup> , and 4-41% to 52-70% efficacy at 1x10 <sup>9</sup> in the first and second collections, respectively
Basso <i>et al</i> <sup>(60)</sup>	Artificial larval infestations	The E9 strain was used at 1x10 <sup>8</sup> on 38, 41, 48, 55 & 61 d p.i. with increased reduction (87-94%) at 35-48 days
Ojeda-Chi <i>et al</i> <sup>(10)</sup>	Artificial larval infestations	The Ma34+Ma14 (1x10 <sup>8</sup> ) combination was given by 3 manual applications each 15 d. The experiment included 2 periods. 67 & 100% efficacy was obtained at 35 & 28 d post-treatment, respectively.
Angel-Sahagun <i>et al</i> <sup>(58)</sup>	Natural larval infestations	Ma14 (1x10 <sup>8</sup> ) was evaluated for larval reduction. 58.3% reduction was obtained by 21 d post-treatment

con distintas cepas y concentraciones del hongo. Las variaciones de virulencia y patogenicidad están influenciadas por factores como la variación en las secreción de proteasas y enzimas quitinolíticas durante el proceso de infección; de la concentración utilizada (a mayor concentración mayor eficacia); etapa de desarrollo, hay cepas que tienen mayor eficacia en garrapatas adultas que en larvas<sup>(26,46)</sup>, otras afectan a las ninfas de *R. microplus*<sup>(28)</sup>, hay cepas que reducen la eclosión, otras tienen efecto sobre la oviposición<sup>(30,52)</sup>. Además se ha visto que el lugar de procedencia de las cepas influye en su tolerancia a la luz UV; Bidochka *et al*<sup>(53)</sup> evaluaron el comportamiento genético de varias cepas, y reportan que las cepas provenientes de suelos agrícolas exhiben una alta tolerancia a la luz UV en comparación de las provenientes de los suelos forestales.

En el Cuadro 2 se muestran los resultados de trabajos desarrollados *in vivo*, en infestaciones

fungal germination. It has also been shown that when the concentrations of some sweat components increase (sodium, nitrogen, and potassium) fungal growth is enhanced, and the same is valid for skin microflora. Skin pH varies depending on the bodily region, the geographic area, and animal age. Skin pH can either promote or limit the growth of *M. anisopliae*, which grows in a pH range of 2.5 to 10.5, depending on the strain. Treatment application time is one additional factor influencing the biology of *M. anisopliae*<sup>(55,56,57)</sup>.

Regarding trials performed in larvae-infested grasslands, variations observed can be influenced by the formulations used. Ángel-Sahagún *et al*<sup>(58)</sup> evaluated four different formulations (Tween 80, clay (Celite), mineral oil (Citroline), and wheat bran). The group treated with the wheat bran-based formulation showed the best results. Other workers<sup>(59,60)</sup> have used a formulation based on Tween and distilled water, or wheat bran alone<sup>(10)</sup>.

naturales y artificiales de garrapatas adultas y larvas. En los trabajos realizados en animales, las variaciones en la eficacia de las cepas se pueden relacionar directamente con los factores climáticos y lugar de procedencia de las cepas, ya que existen cepas que presentan una mayor tolerancia a altas temperatura y exposición a rayos UV<sup>(52,53)</sup>, así como al microambiente del animal, como es la temperatura de la piel, ya que se ha demostrado<sup>(30)</sup> que al incrementarse la temperatura por encima de 34 °C empieza a reducirse la germinación del hongo.

Con relación a la composición química de las secreciones, se ha visto que los lípidos de los que está constituido el cebo, influyen en la germinación fúngica; también se ha demostrado que al incrementarse algunos componentes del sudor (sodio, nitrógeno y potasio) se favorece el crecimiento fúngico y la microflora de la piel. El pH de la piel varía dependiendo de la región, el área y edad del animal favoreciendo o limitando el crecimiento de *M. anisopliae*, el cual crece en un rango de pH de 2.5 a 10.5, dependiendo de la cepa. La hora de aplicación de los tratamientos es otro factor que influye en la biología del hongo<sup>(55,56,57)</sup>.

En cuanto a los trabajos realizados en praderas infestadas con larvas, las variaciones que se presentaron pueden estar influenciadas por las fórmulas utilizadas. Ángel-Sahagún *et al*<sup>(58)</sup> evaluaron cuatro formulaciones, Tween 80, arcilla (Celite) aceite mineral (Citrolina) y salvado de trigo, obteniendo mayor eficacia en el grupo tratado con salvado de trigo. Otros investigadores<sup>(59,60)</sup> han utilizado una fórmula a base de Tween y agua destilada o bien únicamente<sup>(10)</sup> salvado de trigo. Otro factor involucrado es la rehidratación de los conidios, ya que de lo contrario se inactivan y se inhibe la germinación y la tolerancia de las cepas a la exposición a altas temperaturas y rayos UV<sup>(6)</sup>.

#### *Efecto en otros insectos de importancia en medicina veterinaria*

*M. anisopliae* también ha demostrado efectividad sobre moscas adultas de *Haematobia irritans* en condiciones de laboratorio<sup>(29)</sup>, acción ovidica, pupa y larva<sup>(64)</sup>. Galindo *et al*<sup>(65)</sup> encuentran que en condiciones de establo, las cepas de Ma34, Ma14,

One other factor involved is conidium rehydration, since no rehydration results in inactivation, germination inhibition, and decreased tolerance to the exposure to both high temperatures and UV light<sup>(6)</sup>.

#### *d) Effect on other insects of veterinary importance*

*M. anisopliae* has also shown to be effective against adult *Haematobia irritans* flies under laboratory conditions<sup>(29)</sup>, also killing eggs, pupae, and larvae<sup>(64)</sup>. Working on dairies, Galindo *et al*<sup>(65)</sup> found that the Ma34, Ma14, Ma6 and Ma10 strains of *M. anisopliae* are 60-100% effective by 6 to 13 d p.i. In *in vitro* studies on the flea *Ctenocephalides felis felis*, the *M. anisopliae* E9 strain reduced egg hatchability and caused high mortality by 60 h at the  $1 \times 10^7$  concentration, while the Ma595 strain caused 100 % mortality by 72 h<sup>(66)</sup>. Mohanty *et al*<sup>(67)</sup> reported high *in vitro* efficacy of *M. anisopliae* 892 strain on the larval stages of *Anopheles stephes* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. When used in the control of *Varroa destructor*, *M. anisopliae* has caused mortality peaks by 3 to 4 d post-treatment<sup>(68)</sup>.

#### *e) Factors influencing the pathogenicity*

Under field conditions, the weather and the strain origin/virulence impact germination<sup>(6,30)</sup>. Factors affecting the efficacy of *M. anisopliae* can be classified in two groups:

Factors affecting fungal survival. Major environmental factors interfering with *M. anisopliae* growth and mycotoxin production include water activity, temperature, humidity, pH, soil texture (substrate composition), and UV radiation<sup>(6,69,70)</sup>. Studies have shown that high temperature-/UV light-tolerant conidia produce high amounts of saturated fats, trehalose, and mannitol which protect the fungus against membrane protein denaturation<sup>(70,71)</sup>. Other factors to be taken into account include fungus-environment interactions, as well as interactions with other organisms, for example the use of substrates in the environment and the production of metabolites (adaptation to low CO<sub>2</sub> or NaCl levels)<sup>(6)</sup>.

Factors affecting the physiological condition of conidia. Age is a major factor affecting conidia. The younger they are the higher the germination

Ma6 y Ma10 de *M. anisopliae* son efectivas de 60 hasta 100 % de 6 a 13 días pos infección. En estudios *in vitro* realizados en la pulga *Ctenocephalides felis felis*, *M. anisopliae* (cepa E9) reduce la eclosión del huevo y causa alta mortalidad a las 60 h a la concentración de  $1 \times 10^7$ , mientras que la cepa Ma595 presenta 100 % de mortalidad a las 72 h<sup>(66)</sup>. Mohanty et al<sup>(67)</sup>, en estudios *in vitro* para evaluar la patogenicidad de la cepa 892 de *M. anisopliae* en la fase larvaria de los mosquitos *Anopheles stephes* y *Culex quinquefasciatus*, reportan una alta eficacia del hongo para ambas especies. También se ha evaluado<sup>(68)</sup> la eficacia de *M. anisopliae* para el control de *Varroa destructor* y se reportan picos de mortalidad en 3 a 4 días pos tratamiento (PT).

#### e) Factores que influyen en la patogenicidad

A nivel de campo las condiciones climáticas, origen de la cepa y virulencia influyen en la germinación de éstas<sup>(6,30)</sup>. Los factores que afectan la eficacia de *M. anisopliae* se dividen en dos grupos:

Factores que afectan la sobrevivencia. Los principales factores ambientales que interfieren con el crecimiento, producción del hongo y producción de micotoxinas son la actividad del agua, temperatura, humedad, pH, textura del suelo o composición de los sustratos y rayos ultravioleta (UV)<sup>(6,69,70)</sup>. Se han realizado estudios que demuestran que los conidios con tolerancia a altas temperaturas y rayos UV producen altas cantidades de grasas saturadas y altas cantidades de trealosa y manitol, las cuales proveen protección contra la desnaturalización de las proteínas y la membrana<sup>(70,71)</sup>. Otros factores que se deben de tomar en cuenta son las interacciones entre el hongo y el medio ambiente e interacciones con otros organismos, por ejemplo la utilización de sustratos del medio y la producción de metabolitos (adaptación a niveles bajos de CO<sub>2</sub> y NaCl)<sup>(6)</sup>.

Factores que afectan el estado fisiológico de los conidios. La edad es uno de los factores que afectan a los conidios, ya que mientras más jóvenes sean existe una mayor germinación en comparación con los conidios antiguos. El agua favorece la germinación inicial de los conidios<sup>(72)</sup>. La rehidratación de los conidios es vital en las primeras

rate, in contrast with older conidia. Water promotes conidium initial germination<sup>(72)</sup>. Conidial rehydration is vital in the first 48 h since, under stress conditions, only small amounts of mannitol are produced thus conidia can no longer tolerate high temperatures<sup>(6)</sup>.

#### f) Formulations

Conidium application under field conditions is limited by the environment that can promote moisture loss, thus limiting conidial growth and their effects. Leemon et al<sup>(70)</sup> studied the effect of plant oil on *M. anisopliae* conidial germination and penetration, and observed 100 % mortality of *R. microplus* by 2 to 5 d p.i. These results show that oil works as glue between conidia and arthropod cuticle, and increases conidial livability probably by preventing water evaporation.

Studies to evaluate the survival of conidia exposed to UV light in different media (olive oil + solar filter; water + solar filter; and control) found 29 to 40 %, 14 to 24 %, and 4 % conidial survival rates, respectively. These results suggest that both olive oil and solar filters protect conidia against UV radiation, not interfering with germination or pathogenicity. In addition, mixtures including the solar filter resulted in 88 to 94 % larval mortality and 81 to 83 % adult tick mortality.

## INTEGRATED PEST MANAGEMENT

Integrated pest management (IPM) consists of the proper combination of various control tools aiming to destabilize the constitution of populations with higher proportions of genetically-resistant individuals, while maintaining adequate levels of production. IPM is typically associated with a drastic decrease in treatment frequency. As stated above, resistance prevention/management requires not only decreased dependence of antiparasitics, but also using such products on seasons/times/animals in such a way that it does not result in increased genetic selection pressure<sup>(26)</sup>.

In order to achieve an effective management of tick populations, minimizing tick effects, and preserving the available acaricides, an IPM must be used.

48 h ya que, en condiciones de estrés, se produce poco manitol y los conidios ya no pueden tolerar altas temperaturas<sup>(6)</sup>.

#### f) *Formulaciones*

La aplicación de los conidios en condiciones de campo se encuentra limitada por las condiciones medioambientales que favorecen la pérdida de humedad de éstas, limitando su crecimiento y efecto. Leemon *et al*<sup>(70)</sup> realizan estudios, para evaluar el efecto de aceite vegetal sobre la germinación y penetración de los conidios de *M. anisopliae*, y observan 100 % de mortalidad de las garrapatas *R. microplus*, a los 2 a 5 días pos infección; estos resultados demuestran que el aceite sirve como adhesivo entre los conidios y la cutícula de los artrópodos, y posiblemente al reducir la evaporación de agua incrementa la viabilidad de las mismas.

Al realizar estudios para evaluar la sobrevivencia de conidios expuestos a rayos UV en diferentes medios (aceite de oliva+ filtro solar, de agua+ filtro solar y el control), se encontraron 29 a 40 %, 14 a 24 % y 4 % de sobrevivencia de los conidios respectivamente. Estos resultados sugieren que el aceite de oliva y los filtros solares confieren protección a los conidios de los rayos UV y no interfieren en su germinación y patogenicidad; además en las mezclas en las que se usa filtro solar se reportan de 88 a 94 % de mortalidad en larvas y de 81 a 83 % en garrapatas adultas.

### MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS

El manejo integrado de plagas (MIP) combina adecuadamente varias herramientas de control, con la finalidad de desestabilizar la formación de aquellas poblaciones con mayor proporción de individuos genéticamente resistentes, manteniendo un nivel adecuado de producción; generalmente se asocia MIP a una drástica disminución de la frecuencia de tratamientos. Como se ha visto anteriormente, para prevenir y manejar la resistencia, no sólo es suficiente disminuir la dependencia a los antiparasitarios, sino también utilizarlos en épocas/momentos/animales que no aumenten la presión de selección genética<sup>(26)</sup>.

Most of the tools needed to obtain these objectives are already available including molecular techniques, spatial distribution of both, ticks and acaricide resistance, simulation models, satellite imaging, vaccines, and biological control. Bahiense *et al*<sup>(55)</sup> evaluated the deltamethrin-*M. anisopliae* combination against pyrethroid-resistant *R. microplus* larvae. These authors obtained high mortality rates and concluded that the combination can be used as a tool for integrated tick control.

Even though *M. anisopliae* is a good IPM candidate, its massive production and formulation process are directly impacted by production cost, survival rate, virulence, and field efficacy. The process used for fungus production and formulation depends on the strain, the target species, the environment, the formulation, and the application method. Production and livability of *M. anisopliae* conidia are based on three manufacturing systems: solid substrates, fluid substrates, or a two-phase system. The two first substrates cited have shown to be more efficacious for the reproduction of extremely high quality conidia<sup>(74)</sup>.

### CONCLUSIONS

*R. microplus* exerts deleterious effects on cattle production due to both direct effects and the diseases that it transmits. *R. microplus* control has been based on the use of ixodicides, but the irrational use of such products has resulted in resistant tick populations. Using the entomopathogenic fungus *M. anisopliae* is proposed as an alternative treatment due to its efficacy in the control of the parasitic and non-parasitic stages of *R. microplus* under laboratory and field conditions. Nevertheless, these studies are only the beginning to learn about the use of this new way to approach the problem of tick resistance to chemical ixodicides, but more research is warranted to evaluate the effect of *M. anisopliae* on both the non-parasitic (correct application season, treatment periodicity) and parasitic phases. Likewise, application strategies must be developed for its use in Mexico's large grassland surface areas where livestock production is practiced. The most promising control strategy of *R. microplus* is the integrated management that combines several tools including the use of entomopathogenic fungi, aiming

Para poder realizar un manejo efectivo de las poblaciones de las garrapatas, minimizar sus efectos y preservar los acaricidas disponibles, se debe emplear un MIP. La mayoría de las herramientas para alcanzar estos objetivos se encuentran disponibles y se pueden incluir las técnicas moleculares, la distribución espacial de la garrapata y de los acaricidas resistentes, simulación de modelos, imágenes satelitales, vacunas y control biológico. Por ejemplo Bahiense *et al.*<sup>(55)</sup> evaluaron la asociación entre deltametrina y el hongo entomopatógeno *M. anisopliae* contra larvas resistentes a piretroides de *R. microplus*, observan altas mortalidades, y concluyen que esta asociación puede ser utilizada como una herramienta para el control integrado de la garrapata.

*M. anisopliae* es un candidato para el MIP; sin embargo, su producción en masa y proceso de formulación está directamente influenciada por el costo de producción, sobrevivencia, virulencia y eficacia en el campo. El proceso utilizado para su producción y formulación depende de la cepa, especie a la que afecta, medio ambiente, formulación y método de aplicación. La producción y viabilidad de los conidios de *M. anisopliae* se basa en tres sistemas de producción: en sustratos sólidos, líquidos y el difase, de las cuales las dos primeras han demostrado mayor eficacia para la reproducción de conidios de muy alta calidad<sup>(74)</sup>.

## CONCLUSIONES

*R. microplus* produce daños a la producción bovina por acción directa y por las enfermedades que transmite. Su control se ha basado en el uso de ixodicidas; sin embargo, su uso irracional ha generado poblaciones de *R. microplus*, resistentes. Una alternativa que se propone es el uso del hongo entomopatógeno *M. anisopliae*, el cual ha demostrado ser eficaz para el control de las fases parasítica y no parasítica de *R. microplus* en condiciones de laboratorio y de campo. Sin embargo, estos estudios son el inicio de una forma nueva de abordar la problemática de la resistencia de las garrapatas hacia los ixodicidas químicos, pero se necesitan más estudios para evaluar su efecto en su fase no parasítica (época adecuada de

to decrease our dependence on antiparasitic drugs. These tools must be used in the right seasons, times and animals in such a way that genetic pressure for the selection of ixodicide-resistant tick populations does not longer occur.

*End of english version*

aplicación, periodicidad de tratamiento) y su fase parasítica. Así también, se deben de buscar estrategias para su aplicación en las grandes extensiones que ocupa la ganadería mexicana. El control más promisorio de *R. microplus* es el manejo integrado mediante la combinación de varias herramientas incluyendo el uso de los hongos entomopatógenos y vacunas, con la intención de disminuir la dependencia a los antiparasitarios y utilizarlos en épocas/momentos/animales que no aumenten la presión de selección genética a los ixodicidas disponibles.

## LITERATURA CITADA

1. Rodríguez-Vivas RI, Quiñones AF, Fragoso SH. Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. En: Enfermedades de importancia económica en producción animal. Rodríguez-Vivas RI editor. México DF: McGraw-Hill-UADY; 2005:571-592.
2. Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Vivas RI, Fragoso-Sánchez H. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. Arch Med Vet 2006;38:105-113.
3. Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Arévalo F, Fragoso-Sánchez H, Santamaria VM, Rosario-Cruz R. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. Vet Parasitol 2006;136:335-342.
4. Kay BH, Kemp H. Vaccines against arthropods. Am J Trop Med 1994;50:87-96.
5. Samish M, Ginsberg H, Glazer I. Biological control of ticks. Parasitol 2004;129:S389-S403.
6. Dantyni P, Nanguy S. Significance of the physiological state of fungal spores. Int J Food Microbiol 2009;134:16-20.
7. Frazzon GAP, Vaz Jr SI, Masuda A, Schrank A, Vainstein HM. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. Vet Parasitol 2000;94:117-125.
8. Polar P, Aquino M, Kairo M, Moore D, Pegram S, John S. Thermal Characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control on cattle ticks. Vet Parasitol 2005;3:159-167.

CONTROL DE *Rhipicephalus microplus* MEDIANTE EL USO DE *Metarhizium anisopliae*

9. Alonso-Díaz MA, García L, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutiérrez R, Angel-Sahagún C, Rodríguez-Vivas RI, Fragoso-Sánchez H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. *Vet Parasitol* 2007;147:336-340.
10. Ojeda-Chi MM, Rodríguez-Vivas RI, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutiérrez 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.
11. Barker SC, Murrell A. Systematic and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitol* 2004;129:15-36.
12. Estrada-Peña A, Venzal M. High resolution predictive mapping for *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) in Mexico and Southern Texas. *Vet Parasitol* 2006;142:350-358.
13. Murrell A, Campbell JH, Barker SC. Phylogenetic analysis of the Rhipicephalian ticks indicates that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. *Mol Phylog Evol* 2000;16:1-7.
14. Núñez J. Taxonomía y ciclo biológico de *Boophilus microplus*. En: Nari A, Fiel C. editores. Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control. Montevideo, Uruguay: Editorial Hemisferio Sur; 1994:289-299.
15. Taylor M, Coop MA, Wall RL. *Veterinary parasitology*. Third ed. London, UK: Blackwell Publishing; 2007.
16. Jonsson N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet Parasitol* 2006;137:1-10.
17. Pruet JH. Immunological control of arthropod ectoparasites a review. *Int J Parasitol* 1999;29:255-258.
18. Taylor MA. Recent developments in ectoparasiticides. *Vet J* 2001;61:253-268.
19. George JE, Pound JM, Davey RB. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitol* 2004;129:S353-S366.
20. Aguilar-Tipacamu G, Rodríguez-Vivas RI. Effect of moxidectin against natural infection of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) in the Mexican Tropics. *Vet Parasitol* 2003;111:211-216.
21. Rodríguez-Vivas RI, Arieta-Román JR, Perez-Cogollo LC, Rosado-Aguilar JA, Ramirez-Cruz GT, Basto-Estrella G. Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el ganado bovino [en prensa]. *Arch Med Vet* 2010;(42).
22. Rodríguez-Vivas RI, Rodríguez-Arevalo F, Alonso-Díaz MA, Fragoso-Sánchez H, Santamaría VM, Rosario-Cruz R. Amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms from the state of Yucatan, Mexico: Potential risk factors. *Prev Vet Med* 2006;75:280-286.
23. Rodríguez-Vivas RI, Rivas AL, Chowell G, Fragoso SH, Rosario CR, García Z, Smith SD, Williams JJ, Schwager, SJ. Spatial distribution of acaricide profiles *Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in south eastern Mexico. *Vet Parasitol* 2007;146:158-169.
24. Miller RJ, Almazán GC, Estrada OM, Davey RB, George JE, A survey for fipronil-and-ivermectin-resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected in northern Mexico and the options for the management of acaricide-resistant ticks with pesticides. En: García VZ editor. VI Seminario Internacional de Parasitología. Impacto de las enfermedades parasitarias sobre la ganadería globalizada. INIFAP-INFARVET-AMPAVE-CNG-UV. Veracruz, México. 2008.
25. Perez-Cogollo LC, Rodríguez-Vivas RI, Ramirez-Cruz GT, Miller RJ. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Vet Parasitol* 2010;168:165-169.
26. FAO. Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants. 2004; Module 1:56.
27. Da Silva I, Pohl P, De Freitas D. Caracterización de resistencia para acaricidas en garrapatas *B. microplus*. *Acta Sci Vet* 2005:109-117.
28. Kaaya GP, Hassan S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Exp Appl Acarol* 2000;24:913-926.
29. López LIR, Galindo VE, Ángel SCA, Lezama GR, Silva AJM, López LM. Susceptibilidad de adultos de la mosca del cuerno *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) a diversos aislados del hongo *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes). Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria, Colima, México. INIFAP-Industria Farmacéutica Mexicana. 2004
30. Polar P, Moore D, Kairo M, Ramsbhag A. Topically applied myco-acaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. *Exp Appl Acarol* 2008;46:119-148.
31. Ferron P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Rev Entomol* 1978;23:409-442.
32. Biscoff JF, Rehner SA, Humber RA. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycol* 2009;101:512-530.
33. Tulloch M. The genus *Metarhizium*. *Trans Brit Mycol Soc* 1976;66:407-411.
34. Driver F, Milner RJ, Trueman JWH. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol Res* 2000;104:134-150.
35. Rath AC, Worledge D, Koen TB, Rowe BA. Long-term field efficacy of the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae* against the subterranean scarab, *Adoryphorus couloni*. *Biocontr Sci Technol* 1995;5:439-451.
36. Soares GG, Marchal M, Ferron P. Susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera:Curculionidae) larvae to *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviridae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) at two different temperatures. *Environ Entomol* 1993;12:1887-1891.
37. Humbert RA. Evolution of entomopathogenicity in fungi. *J Invertebr Pathol* 2008;98:262-266.
38. Kurtti T, Keyhani N. Intracellular infection of tick cell lines by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiol* 2008;154:1700-1709.
39. Li J, Feng M. Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. *Mycol Res* 2009;113:93-99.
40. Arruda, W, Lübeck I, Achrank IA, Henning M. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Exp Appl Acarol* 2005;37:231-244.
41. Bittencourt VREP, Mascarenhas A, Horacio J. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. *Ciência Rural* 1999;29:351-354.
42. Silva W, Santi L, Berger M, Pinto A, Guimaraes J, Schrank A, Vainteim M. Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. *Proc Biochem* 2009;34:829-834.
43. Fang W, Pava-ripoll MS, Wang S, Leger R. Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fung Genet Biol* 2009;46:277-285.
44. Kaaya GP, Kokwaro ED, Seshu-Reddy KV, Munyinyi DM. Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Serratia marcescens* to the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*. *Biocontrol Sci Technol* 1993;3:177-183.
45. Asaff AT, Reyes VY, López EV, De la Torre M. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *Avance y Perspectiva* 2002;21:912.

46. Smith KE, Wall R, Berriatua E, French NP. The use of entomopathogenic fungi for the control of parasitic mites *Psorotes spp.* Vet Parasitol 2000;92:97-105.
47. Kaaya GP, Mwaigi E, Ouna E. Prospect for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variagatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. J Invertebr Pathol 1996;67:15-20.
48. Skrobek B, D'efago D, Butt G, Maurhofer M. Evaluation of different biological test systems to assess the toxicity of metabolites from fungal biocontrol agents. Toxicol Lett 2005;30:1-10.
49. Leyva CG, Galindo EV, Ángel SCA, Lezama GR, López LM, López LLR, Silva AJN, Neptalí J, Rebolledo DO, Molina OJ, Casillas MR. Pruebas de inocuidad del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* cepa Ma2 (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en rata blanca cepa wistar. Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria. Colima, México: INIFAP, Industria Farmacéutica Mexicana. 2004.
50. Goettel MS, Johnson DL. Environmental impact and safety of fungal biocontrol agents, In: Biological control of Locusts and Grasshoppers, Lomer CJ, Prior C editors. CAB International, Wallingford, UK. 1992:356-361.
51. Rath AC, Koen TB, Anderson GC. Field evaluation of the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae* (DAT F-001) as a biocontrol agent for the redheaded pasture Cockchafer, *Adoryphorus couloni* (Coleoptera: carabaeidae). Aust J Agric Res 1995;46:429-440.
52. Fernandes ED, Bittencourt VREP. Entomopathogenic fungi against South American tick species. Exp Appl Acarol 2008;46:71-93.
53. Bidochka MJ, Kamp AM, Lavender TM, Dekoning J, De Croos JNA. Habitat association in two genetic groups of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering cryptic species? Appl Environ Microbiol 2001;67:1335-1342.
54. Lubekc I, Arruda W, Souzaabk, Staniscuaski F, Carlini CR, Schrank A, Vainstein MH. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. Fungal Ecol 2008;1:78-88.
55. Bahiense TC, Fernandes EKK, Bittencourt VREP. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. Vet Parasitol 2006;141:319-324.
56. Fernández-Ruvalcaba M, Zihoua E, García-Vázquez Z. Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Boophilus microplus* sensibles y resistentes a organofosforados. Tec Pecu Mex 2005;43:433-440.
57. Braga GU, Flint SD, Miller CD, Anderson AJ, Roberts DW. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus. Photochem Photobiol 2001;74:734-739.
58. Ángel-Sahagún CA, Lezama-Gutiérrez R, Molina-Ochoa J, Pescador-Rubio A, Skoda SR, Cruz-Vázquez C, *et al.* 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. Vet Parasitol 2010;170:278-286.
59. Bittencourt VREP, Bahiense TC, Fernandes EKK, Souza EJ. Avaliação da ação in vivo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, aplicado sobre *Brachiaria decumbes* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Rev Bras Parasitol Vet 2003;12:73-82.
60. Basso LA, Monteiro A, Belo M, Soares V, Garcia M, Alves D. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. Pesq Agropec Bras Brasilia 2005;40:595-600.
61. De Castro ABA, Bittencourt VREP, Deamon E, Viegas EDC. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulado. Rev Univ Rural Ser Cien Vida 1997;19:73-82.
62. Polar P, Kairo M, Peterkin D, Moore D, Pegram R, John S.. Assessment of fungal isolates for development of a myco-acaricide for cattle tick control. Vector Borne Zoonot Dis 2005;5:276-284.
63. Correia A, Fiorin AC, Monteiro AC, Verissimo. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. J Invertebr Pathol 1998;71:189-191.
64. Ángel CA, Lezama R, Molina J, Galindo E, López M, Rebolledo O, Cruz C, Reyes WP, De Skoda SR, Foster J. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). J Insect Sci 2005;5:1-8.
65. Galindo E. Uso de Hyphomycetes entomopatógenos para el control de *Haematobia irritans* (L.) sobre bovinos en el Estado de Colima [Tesis doctoral]. Colima, México: Universidad de Colima; 2005.
66. De Melo D, Verton E, Fernandes K, Da Costa G, Scott F, Bittencourt V. Virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to *Ctenocephalides felis felis*. Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann NY Acad Sci 2008;(1149):388-390.
67. Mohanty S, Raghavendra K, Mittal P, Dash A. Efficacy of culture filtrates of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. J Ind Microbiol Biotechnol 2008;35:1199-1202.
68. Kanga L, Jones W, James R. Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey Bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies. J Econ Entomol 2003;96:1092-1099.
69. Meyling N, Eilenberg J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. Biol Control 2007;43:145-155.
70. Leemon D, Turner D, Jonsson N. Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). Vet Parasitol 2008;156:248-260.
71. Fernandes KK, Rangel ED, Moraes A, Bittencourt VREP, Roberts D. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium* and thermotolerance of *Beauveria*. J Invertebr Pathol 2008;98:69-78.
72. Leemon D, Jonsson N. Laboratory studies on Australian of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus* J Invertebr Pathol 2008;97:40-49.
73. Hedimbi M, Kaaya G, Singh S, Chimwamurombe P, Gindin G, Glazer I, Samish M. Protection of *Metarhizium anisopliae* conidia from ultra-violet radiation and their pathogenicity to *Rhipicephalus evertsi evertsi* ticks. Exp Appl Acarol 2008;46:149-156.
74. Kassa A, Brownbridge M, Parker BL, Skinner M, Gouli V, Gouli S, Guo, M, Lee F, Hata T. Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Mycol Res 2008;112:583-591.