



I



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CENTRO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN EN GANADERÍA

TROPICAL

EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE
LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO DE COLONIAS DE HONGOS
ENTOMOPATÓGENOS AISLADOS DE UNIDADES DE PRODUCCIÓN
BOVINA EN EL TRÓPICO MEXICANO

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

MARÍA LOURDES LOZANO VELÁZQUEZ

Asesores:

Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz

Dr. Mathieu Hautefeuille

México, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA	6
3.1 Importancia de la ganadería bovina	6
3.2 Importancia de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i>	7
3.2.1 Impacto económico de la garrapata al sector ganadero	8
3.2.2 Métodos de control convencionales	9
3.2.3 Resistencia de la garrapata a los acaricidas	10
3.2.4 Métodos de Control alternativo de la garrapata	11
3.3 Uso de hongos entomopatógenos como control biológico de la garrapata	14
3.4 <i>Metarhizium anisopliae</i>	15
3.4.1 Ciclo biológico de los hongos entomopatógenos	17
3.4.2 Antecedentes del uso de <i>Metarhizium anisopliae</i> para el control de la garrapata	18
3.5 Factores abióticos que limitan el efecto acaricida de <i>M. anisopliae</i> en campo	21
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	26
6. MATERIAL Y MÉTODOS	27
6.1 Área de estudio	27
6.2 Obtención de conidias	27
6.3 Producción de conidias y preparación del inóculo	28
6.4 Tratamientos de irradiación, lámparas y filtros	28
6.5 Diseño experimental y mediciones	30

6.6 Análisis estadístico	31
7. RESULTADOS	32
7.1 Efecto de la radiación UV sobre el porcentaje de germinación de conidias de <i>M. anisopliae</i> .	32
7.2 Efecto de la radiación UV sobre el crecimiento de colonias de conidias de <i>M. anisopliae</i> .	34
8. DISCUSIÓN	36
9. CONCLUSIÓN	40
10. REFERENCIAS	41
11. FIGURAS	
Figura 1. Colonia de <i>Metarhizium anisopliae</i>	15
Figura 2. <i>M. anisopliae</i> .	16
Figura 3. Espectro de irradiación emitido por la Luz solar.	22
12. CUADROS	
Cuadro 1. Tolerancia de ocho cepas de HE (<i>Metarhizium anisopliae</i>) al efecto de la radiación UV-A sobre el porcentaje (%) de germinación de conidias.	32
Cuadro 2. Tolerancia de ocho cepas de HE (<i>Metarhizium anisopliae</i>) al efecto de la radiación UV-A + UV-B sobre el porcentaje (%) de germinación.	33
Cuadro 3. Tolerancia de ocho cepas de HE (<i>Metarhizium anisopliae</i>) al efecto de la radiación UV-A sobre el crecimiento de colonias (UFC).	34
Cuadro 4. Tolerancia de ocho cepas de <i>Metarhizium anisopliae</i> al efecto de la radiación UV-A + UV-B sobre el crecimiento de colonias (UFC).	35

RESUMEN

LOZANO VELÁZQUEZ MARÍA DE LOURDES. Efecto de la exposición a radiación ultravioleta sobre la germinación y el crecimiento de colonias de hongos entomopatógenos aislados de unidades de producción bovina en el trópico mexicano, bajo la dirección de:

Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz y Dr. Mathieu Hautefeuille

El uso de hongos entomopatógenos es una alternativa promisorio para el control de la garrapata *Rhipicephalus microplus*, que afecta al ganado bovino. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la exposición a la radiación ultravioleta (UV) sobre el porcentaje de germinación de conidias y el crecimiento de colonias de ocho cepas de *M. anisopliae*. El tratamiento de irradiación con rayos UV (UV-A y UV-B), se realizó con una lámpara de emisión de radiación ultravioleta. Las conidias de cada cepa fueron expuestas a los tratamiento de radiación UV (A y A+B) durante 3 h. Se utilizó un grupo control negativo, un grupo control positivo y tres réplicas para cada tratamiento. Para evaluar el efecto de la radiación UV sobre el crecimiento de colonias y sobre la germinación de conidias, se emplearon las pruebas de Kruskal Wallis y ANOVA, respectivamente. Las cepas 25MaV, 08MaV, y 31MaV mostraron mayor tolerancia a la exposición a la radiación UV-A, evaluado mediante la germinación de conidias. La radiación UV- A+B disminuyó el porcentaje de germinación de todas las cepas de *M. anisopliae*. Las ocho

cepas evaluadas (55MaV, 35MaV, 31MaV, 25MaV, 13MaV, 08Ma, 05MaV, 02MaV) mostraron buena tolerancia a la radiación UV-A, medido mediante el crecimiento del colonias. La radiación UV- A+B no afectó significativamente el crecimiento de colonias de seis de las cepas de *M. anisopliae* evaluadas (35MaV, 13MaV, 08MaV, 05MaV, 31MaV y 02MaV) ($P > 0.05$).

2. INTRODUCCIÓN

En las regiones tropicales y subtropicales del mundo, la garrapata *Rhipicephalus microplus* se considera el ectoparásito de ganado bovino de mayor importancia, debido a las pérdidas económicas que ocasiona (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012). Estas pérdidas se asocian a los daños directos e indirectos que causa, que van desde la disminución de los parámetros productivos hasta la transmisión de enfermedades como babesiosis y anaplamosis (Alonso-Díaz *et al.*, 2006; Ojeda-Chi *et al.*, 2011).

El principal método de control de las garrapatas es el uso de ixodicidas químicos de las familias de los organofosforados, piretroides, amidinas, lactonas macrocíclicas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012) e inhibidores del desarrollo. Sin embargo, durante los últimos años y posiblemente debido al uso irracional de estos ixodicidas, se ha ejercido una fuerte presión de selección en las poblaciones de garrapatas lo cual a favorecido la sobrevivencia de individuos resistentes o multiresistentes a estos productos (Alonso-Díaz *et al.*, 2006). Lo anterior, ha incentivado la búsqueda de alternativas de control que puedan ser utilizadas dentro de un manejo integral de plagas (Ojeda-Chi *et al.*, 2011). Además, estas alternativas de control pueden favorecer la producción de alimentos libres de residuos químicos, una menor contaminación ambiental y el retraso de la resistencia de las garrapatas a productos a los cuales aún son susceptibles o de nueva generación. Los métodos alternativos de control incluyen el uso de razas de bovinos que presentan mayor resistencia genética a la infestación por garrapatas, manejo de pastizales, utilización de vacunas y control biológico (Ojeda-Chi *et al.*, 2011).

El control biológico basado en el uso de hongos entomopatógenos es una alternativa promisorio. El hongo *Metarhizium anisopliae* posiblemente ha sido uno de los más estudiados debido a que algunas cepas poseen efecto patogénico sobre diferentes estadios de *R. microplus* (huevos, larvas, ninfas y adultas) (Alonso-Díaz *et al.*, 2007; López *et al.*, 2009).

El potencial acaricida de *M. anisopliae* se ha evaluado, con excelentes resultados en diversos estudios *in vitro*; no obstante, en condiciones de campo los resultados han sido contradictorios, donde generalmente la eficacia disminuye (Fernandes *et al.*, 2012; Ojeda-Chi *et al.*, 2010). Existen diversos factores ambientales como la exposición a la radiación UV, las altas temperaturas y la variación del porcentaje de humedad (deseccación) que reducen la eficacia de los hongos entomopatógenos como agentes de biocontrol (Fernandes *et al.*, 2012.). Para contrarrestar esto, se han realizado distintos esfuerzos, como la adición de fotoprotectores a las formulaciones de hongos (Fernandes *et al.*, 2012.; Leemon y Jonsson 2008), la aplicación nocturna de los tratamientos (Alonso-Díaz *et al.*, 2007), y la selección de cepas con mayor tolerancia a la luz solar (Braga *et al.*, 2001a). Lo anterior se debe a que las conidias se inactivan rápidamente por la acción de la radiación UV que actúa como uno de los principales factores que reducen su efecto patógeno (Braga *et al.*, 2001b). Se ha observado que cuando las conidias se exponen a la luz solar UV-A (320-400 nm) y UV-B (280-320 nm) su viabilidad disminuye. Por lo anterior, se ha planteado la hipótesis de que el lugar de procedencia de las cepas de hongos entomopatógenos influyen sobre la tolerancia/susceptibilidad a la radiación UV (Braga *et al.*, 2001a; Rangel *et al.*, 2005). Los hongos aislados de lugares cercanos al ecuador son más resistentes, debido a que la radiación en esta zona es mayor y en consecuencia pueden desarrollar mecanismos de

adaptación/evolución (Braga *et al.*, 2001a). Por lo tanto, cuando se evalúan cepas de *M. anisopliae* con efecto acaricida se desea que además estén adaptadas a condiciones ambientales locales (cepas endémicas) (Fernandes *et al.*, 2012).

En un estudio previo, en la zona centro-norte del estado de Veracruz, Fernández-Salas (2013) aisló 59 cepas de *Metarhizium anisopliae* de suelos en unidades de producción bovina con alta prevalencia de garrapatas *R. microplus* y *Amblyomma cajennense*. De estas, al menos ocho mostraron una elevada eficacia mico-acaricida (> 90%) contra diferentes estadios de *R. microplus*. Sin embargo, se desconoce su tolerancia/susceptibilidad a la luz solar, específicamente a la radiación UV-A y UV-B. Por tal motivo fue necesario realizar estudios *in vitro* para evaluar el nivel de resistencia que poseen estas cepas de *M. anisopliae* a la radiación UV. Esta información es básica para poder seleccionar cepas que permanezcan viables por mayor tiempo en condiciones similares a las que se enfrentarán en campo.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Importancia de la ganadería bovina

La ganadería bovina se considera una de las actividades más importantes dentro del proceso económico de algunos países; además, es una fuente fundamental de alimentos básicos para la seguridad alimentaria de la población. De acuerdo a la FAO (2013), más de 1 billón de personas en el mundo dependen económicamente del sector ganadero.

México produce anualmente alrededor de 11 mil millones de litros de leche y 1.8 millones de toneladas de carne de res; ocupa el sexto lugar a nivel mundial como país productor de carne de bovino y contribuye con el 2.8% del total de la producción (SAGARPA, 2014) después de países como EUA (19.3%), Brasil (11.2%), China (10.0%), Argentina (4.2%) y Australia (3.4%). De acuerdo con el Censo Agrícola, Ganadero y Forestal de 2007 (Financiera Nacional de Desarrollo, 2014), en México existen alrededor de 1.13 millones de unidades de producción de ganado bovino, de las cuales, aproximadamente el 58 % tienen como actividad principal la engorda de bovinos; el 34% mantienen vientres: para leche (40%), carne (32%) o doble propósito (28%); y el resto producen principalmente sementales. La ganadería de doble propósito constituye el principal sistema de producción bovino en las regiones tropicales del país. Este sistema de producción aporta el 38% de la carne y el 14% de la leche que se consume en el país (Gallardo *et al.*, 2010). El estado de Veracruz es la principal entidad federativa productora de carne de bovino a nivel nacional, produce el 15.1% del total nacional (261 581 toneladas) (Financiera Rural, 2012).

Uno de los aspectos de mayor importancia dentro de las unidades de producción bovina es la sanidad animal debido a la presencia de diversas enfermedades. En zonas tropicales y subtropicales, como lo es gran parte del estado de Veracruz, la presencia de garrapatas es uno de los principales problemas ya que producen un impacto negativo sobre la salud animal y la economía de los productores (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

3.2 Importancia de la garrapata *Rhipicephalus microplus*

En México, se han reportado 82 especies de garrapatas que afectan tanto a animales silvestres como domésticos. *Rhipicephalus microplus* se considera la garrapata de mayor impacto al sector ganadero debido a su amplia distribución, a las enfermedades que transmite y a las pérdidas económicas que ocasiona (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014). *Rhipicephalus microplus* es un acaro artrópodo, de la familia Ixodidae (garrapatas duras), ectoparásito hematófago del ganado bovino. Su distribución geográfica está determinada por factores ambientales como la temperatura, la humedad relativa, el tipo de vegetación y la presencia y número de hospederos susceptibles. Debido a su capacidad de adaptación y propagación, en el país, *R. microplus* está presente en un área de distribución de aproximadamente 1, 043 772 Km² (53% del territorio nacional), que abarca zonas tropicales, templadas y áridas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011). El ciclo de vida de *R. microplus* se caracteriza por la necesidad de un solo hospedero, primordialmente bovinos; y se lleva a cabo durante cuatro estados evolutivos; huevo, larva, ninfa y adulto. Los cuales se desarrollan en tres importantes etapas o fases: parasítica, no parasítica (vida libre) y de encuentro (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006). La fase parasítica ocurre sobre el mismo

hospedero, y comprende desde que la larva se implanta sobre el animal, se alimenta, muda a ninfa y posteriormente a adulta. Los machos y las hembras copulan sobre el hospedero. Las hembra teleoginas se desprenden y caen al suelo, con este evento inicia la fase de vida libre. La etapa parasítica dura aproximadamente 21 días en condiciones óptimas (Nuñez *et al.*, 1982). La fase de vida libre o no parasítica se desarrolla en el medio ambiente y comprende el tiempo que transcurre desde el desprendimiento de la teleogina, la oviposición, hasta la aparición de las larvas en la vegetación. Una hembra repleta de *R. microplus* pone en promedio de 2,500-3,500 huevos (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006). La fase de encuentro es la que da inicio a otro ciclo de vida de *R. microplus* y se define como el proceso de transferencia de las larvas desde la vegetación al hospedero.

3.2.1 Impacto económico de la garrapata al sector ganadero

El impacto económico negativo de *R. microplus* a la ganadería, se asocia a los daños directos e indirectos que causa; además, del incremento en los costos de producción provocados por el tratamiento, como es la compra del producto (ixodicidas químicos), la mano de obra y el equipo que se utiliza para su aplicación (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012). Con relación a los daños directos, se ha reportado que las infestaciones de garrapatas disminuyen los parámetros productivos, y tienen un impacto negativo sobre la ganancia diaria de peso debido a una marcada disminución del consumo de alimento. Se ha observado que un bovino infestado reduce su consumo de alimento (4.37 kg) en comparación con animales no parasitados por garrapatas (5.66 kg) (Jonsson, 2006). Se estima que un bovino infestado por *R. microplus* pierde aproximadamente 0.26 kg/garrapata/año (Ojeda-Chi *et al.*, 2011); de estas pérdidas, el 65 % se atribuye al estrés y

anorexia causado por la irritación de las picaduras, y el resto se atribuye a la anemia que podría presentar el animal por la constante pérdida de sangre (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014). Otro problema asociado a las infestaciones por garrapatas es la depreciación del valor de las pieles debido al daño producido por las picaduras y el desarrollo de abscesos. En sistemas de producción de doble propósito, la tasa de producción de leche o inclusive el adecuado crecimiento del becerro se pueden ver afectados al perderse la integridad de uno o más de los cuartos de la glándula mamaria por el desarrollo de abscesos sobre la misma (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006). El efecto indirecto que causan las garrapatas está vinculado a la transmisión de enfermedades lo que puede llegar a provocar la muerte de los animales. Los principales agentes etiológicos que transmiten son *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* y *Anaplasma marginale* causantes de la anaplasmosis y la piroplasmosis. Además de la problemática que se genera tanto para la movilización y comercialización de animales dentro del territorio nacional; así como, las exportaciones a diferentes países.

Es importante mencionar que la acción nociva de *R. microplus* sobre el ganado bovino es proporcional al número de garrapatas que lo parasita y al grado de resistencia/susceptibilidad del animal (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

3.2.2 Métodos de control convencionales

En México, el método de control químico (ixodicidas) es la estrategia más utilizada contra la garrapata *R. microplus* (Alonso-Díaz *et al.*, 2006; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014; Ojeda-Chi *et al.*, 2011). Los ixodicidas más empleados pertenecen a las familias de los organofosforados (OF), piretroides sintéticos (PS), amidinas (Am), lactonas macrocíclicas

(LM), fenilpirazolonas y en los últimos años se ha incrementado el uso de los inhibidores del desarrollo (Ojeda-Chi *et al.*, 2011).

El objetivo de los métodos químicos de control, es romper el ciclo de vida de las garrapatas, para lograr esto, es necesario aplicarlos a intervalos específicos determinados por la región, especie de garrapata y eficacia residual del ixodicida (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014).

Algunas de las desventajas de usar este método de control son el alto costo de su empleo, los posibles efectos adversos que se provocan al humano, al medio ambiente, a las poblaciones de fauna benéfica y a la generación de resistencia (Alonso-Díaz *et al.*, 2006, Ojeda-Chi *et al.*, 2011).

3.2.3 Resistencia de la garrapata a los acaricidas

En diversos estudios se ha reportado la resistencia de diferentes poblaciones de garrapatas a las principales familias de ixodicidas que existen (Alonso-Días *et al.*, 2006, Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012). Uno de los principales factores que influyen sobre el desarrollo de resistencia, es el uso indiscriminado que se les ha dado, lo cual ha ejercido una fuerte presión de selección sobre las poblaciones de garrapatas que favorece la sobrevivencia de individuos resistentes o multiresistentes a estos productos (Alonso-Díaz *et al.*, 2006). La resistencia se define como la capacidad evolutiva de ciertos individuos de soportar dosis de un químico, que generalmente son letales para la mayoría de los individuos de una población susceptible (Alonso-Díaz *et al.*, 2006; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012). El desarrollo de resistencia depende de la frecuencia con que se apliquen los insecticidas así como del ciclo biológico de los artrópodos (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012). El principal

problema al que se enfrentan muchos productores actualmente, es la disminución progresiva de insecticidas efectivos debido a la amplia resistencia que presentan las poblaciones de garrapatas, esto incentiva a que los utilicen de manera desmedida. Normalmente la presencia de residuos químicos en productos de origen animal se debe al aumento en la frecuencia y/o dosis recomendadas, lo que repercute tanto en la generación de mayor resistencia, como en la salud humana. La disponibilidad de antiparasitarios efectivos es cada vez más escasa, la generación de poblaciones de garrapatas resistentes a nuevos productos se caracteriza por ocurrir en menor tiempo que el descubrimiento de un nuevo pesticida. El constante desarrollo de estos productos es un tema preocupante para la industria farmacéutica ya que además de ser costoso (100-200 millones de US dólares), es un proceso lento que puede tomar más de diez años para que el producto este disponible de manera comercial (Alonso-Díaz *et al.*, 2006). No obstante, el que muchas poblaciones de garrapatas resulten resistentes a una amplia gama de productos químicos (OPs, SPs, Am y LMs) no significa que algunos de estos productos no produzcan una correcta acción acaricida (Rodríguez-Vivas *et al* 2012). Por lo anterior, se ha incentivado la búsqueda de nuevas estrategias de control de garrapatas que minimicen la presión de selección sobre poblaciones resistentes.

3.2.4 Métodos de Control alternativo de la garrapata

Durante los últimos años se han evaluado diversas estrategias de control alternativo de las garrapatas que puedan ser utilizadas dentro de un manejo integral de plagas. Estas estrategias incluyen, el uso de razas de bovinos resistentes, el pastoreo rotacional, la

protección inmune del hato mediante la utilización de vacunas, el uso de plantas con efecto acaricida y el control biológico (Ojeda-Chi *et al.*, 2011).

La selección de razas de bovinos que presentan mayor resistencia genética a la infestación por garrapatas (*Bos indicus*) ha sido una práctica comúnmente utilizada por los productores de las regiones del país donde existe mayor prevalencia de *R. microplus* (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011). Jonsson (2006) menciona que el ganado *Bos indicus* presenta menores cargas parasitarias de garrapatas (10 - 20 % menos) en comparación al ganado *Bos taurus*.

El manejo de pastizales es otra práctica empleada, se realiza mediante la rotación o descanso de praderas con el fin de reducir el encuentro garrapata-bovino; de esta forma, un gran número de garrapatas en fase de vida libre mueren (hambre y deshidratación) antes de parasitar a los animales. Otro método de control alternativo que se utiliza es la vacunación. Existen dos vacunas disponibles de forma comercial, TickGARDPLUS-® (Australia) y GavacTM (América latina). Ambas vacunas están constituidas por el antígeno Bm86 que es una glicoproteína presente en las células intestinales de las garrapatas. La aplicación de estas vacunas a animales infestados con garrapatas provoca un efecto de reducción de la capacidad reproductiva de las mismas, reduce el número de garrapatas repletas y el peso de los huevos; sin embargo, es importante mencionar que la vacuna no produce la muerte y su efecto se observa a mediano plazo (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

El uso de plantas para el control de garrapatas se ha evaluado de dos formas: 1) plantas que tienen la capacidad de obstaculizar la actividad física de los estadios larvarios de garrapatas y 2) plantas con metabolitos secundarios que poseen efecto acaricidas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014). El tipo de vegetación presente en las praderas para pastoreo puede contribuir o impedir el encuentro garrapata-bovino, por ejemplo; las praderas con alta vegetación y arbustos proporcionan un hábitat ideal para la sobrevivencia de las garrapatas en vida libre,

por otro lado existen plantas que poseen la capacidad de atrapar larvas mediante vellosidades y secreciones viscosas presentes en sus hojas. En México, se han evaluado ciertas gramíneas forrajeras (*Melinis minutiflora*, *Andropogon gayanus*) que son capaces de atrapar, repeler o impedir la parasitosis; la incorporación de este tipo de plantas estratégicamente dentro del potrero puede reducir considerablemente la población de garrapatas disponibles para infestar al ganado (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

Se ha evaluado el efecto acaricida de diversos extractos de plantas (*Calaea serrata*, *Nicotiana tabacum*, *Azadirachta indica* entre otras) donde se demostró que algunos metabolitos secundarios de estas plantas, poseen una importante actividad ixodicida sobre diferentes estadios de *R. microplus*; no obstante, es necesario evaluar algunos aspectos relacionados con la variación de estos metabolitos a través de la época del año y evaluar su efecto *in vivo* (Álvarez *et al.*, 2008; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014).

El control biológico es una forma de control de plagas que busca la destrucción parcial o total de patógenos e insectos plaga, mediante la utilización de organismos vivos (enemigos naturales) (Téllez-Jurado *et al.*, 2009; Ojeda-Chi *et al.*, 2011). Debido a que el control biológico dentro de este documento es un elemento principal, más adelante se retomará con mayor detalle.

El control integral de plagas es un método en el que se combina adecuadamente dos o más estrategias de control de plagas que afecten negativamente a una especie hospedera, generalmente este método se asocia a una disminución marcada del número de aplicaciones de productos químicos, de forma tal que también se reduce el riesgo a la salud humana y ambiental (Ojeda-Chi *et al.*, 2011; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014).

3.3 Uso de hongos entomopatógenos como control biológico de la garrapata

El uso de hongos entomopatógenos como método de control ha ido en aumento debido al potencial que poseen en el manejo de plagas, además de la creciente concientización sobre la seguridad ambiental y humana (Ojeda-Chi *et al* 2011). Los hongos entomopatógenos en vida libre, juegan un papel importante en la regulación de las poblaciones de insectos plaga (Goettel *et al.*, 2005). Los hongos entomopatógenos utilizados como método de control biológico pueden presentar porcentajes de mortalidad más bajos que los producidos por los métodos de control químico. Es importante tener en cuenta que esta diferencia es aceptable ya que el objetivo del control biológico es mantener las plagas en niveles económicamente aceptables al mismo tiempo que se protege el medio ambiente (Goettel *et al.*, 2005). Los hongos entomopatógenos han demostrado ser importantes enemigos de artrópodos y pueden ser utilizados como una alternativa eficiente al uso convencional de métodos de control químico. Se han descrito más de 750 especies de hongos entomopatógenos (Téllez-Jurado *et al.*, 2009). Se sabe que poseen una alta especificidad, puesto que para cada plaga en particular existen cepas específicas, por este motivo las cepas se seleccionan de acuerdo al grado de virulencia que presentan sobre determinada plaga (Cañedo y Ames, 2004; Schrank y Henning, 2010). Dentro de los géneros de hongos entomopatógenos, posiblemente los que más se utilizan son *Metharizium spp*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicilium lecanii*, *Fusarium spp*, e *Isaria fumosorosea* (Téllez-Jurado *et al.*, 2009, Ojeda-Chi *et al.*, 2011).

3.4 *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae posiblemente ha sido uno de los hongos entomopatógenos más estudiados en el control de garrapatas debido a que algunas cepas poseen un efecto patogénico importante sobre diferentes estadios de *R. microplus* (huevos, larvas, ninfas y adultas) (Alonso-Díaz *et al.*, 2007; López *et al.*, 2009; Ojeda-Chi *et al.*, 20011).

Metarhizium anisopliae es un hongo que naturalmente crece en el suelo (20 cm superficiales) (Zimmermann, 2007) y ataca a más de 200 especies de insectos y ácaros de diversos géneros (Ojeda-Chi *et al.*, 2011). Fue aislado por primera vez en 1879 del escarabajo *Anisoplia austriaca* por Metchnicokoff (Zimmermann, 2007). Pertenece al *Phylum Deuteromycota* la clase *Hyphomycetes*, orden *Moniliales*, Familia *Moniliaceae* (Shah y Pell, 2003). *Metarhizium anisopliae* no tiene efecto patogénico sobre plantas, se ha reportado cierto potencial alergénico sobre mamíferos por lo cual es necesario tomar ciertas precauciones para evitar el contacto dérmico o la excesiva inhalación de conidias. No obstante, no se han reportado efectos adversos en el personal de fabricación o aplicación de conidias de forma comercial (Zimmermann, 2007).

Características morfológicas de *M. anisopliae*:

Colonia: redonda, de colores oliváceo, amarillento, verdoso, marrón oscuro, el micelio nutricio puede ser de incoloro a marrón, a veces verdoso.

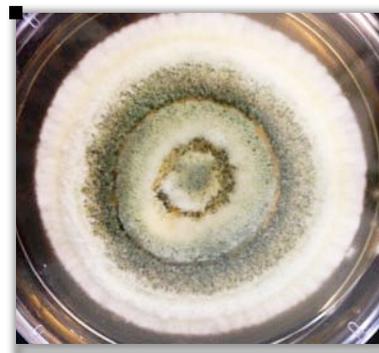


Figura 1. Colonia de *Metarhizium anisopliae*

Conidias: unicelulares, cilíndricas y truncadas, formadas en cadenas muy largas, hialinas a verde oliváceo. Miden $3.5\mu\text{m}$ a $9\mu\text{m}$ de longitud por



1.5 a $3\mu\text{m}$ de diámetro (Cañedo y Ames, 2004).

Figura 2. *M. anisopliae*.

Algunas de las ventajas que se pueden encontrar en la utilización de hongos entomopatógenos como método de control son: mayor seguridad para el hombre, vertebrados e invertebrados, mayor especificidad al atacar solo a la especie deseada y generar menor impacto sobre el medio ambiente (Cañedo y Ames, 2004).

3.4.1 Ciclo biológico de los hongos entomopatógenos

La forma infectiva de los hongos entomopatógenos son las conidias o esporas, cuando una conidia viable está en contacto con la cutícula de un hospedero susceptible inicia el proceso de infección. Para esto, las condiciones ambientales deben de ser favorables (humedad y temperatura) (Schrank y Henning, 2010). El ciclo de vida de los hongos entomopatógenos, se puede dividir en tres fases: 1) la adhesión y germinación de la espora sobre la cutícula del insecto, 2) la penetración al hemocele y 3) el desarrollo y propagación del hongo en el hemocele, lo que generalmente resulta en la muerte del hospedero (Téllez-Jurado *et al.*, 2009).

La adhesión y germinación del hongo sobre el integumento (cutícula) del hospedero son eventos determinantes para que ocurra la infección (Beys Da Silva *et al.*, 2010). Se cree que la fijación de las conidias a la cutícula del hospedero ocurre por mecanismos inespecíficos de adhesión vinculados a la hidrofobicidad de las proteínas presentes en la pared celular de las conidias y la capa lipídica que cubre la cutícula del artrópodo (Beys Da Silva *et al.*, 2010, Schrank y Henning, 2010). Una vez establecido el proceso de adhesión, continúa la penetración que se llevan a cabo mediante mecanismos físicos que consisten en ejercer presión sobre la cutícula hasta romperla, y mecanismos químicos que consisten principalmente en la acción de enzimas hidrolíticas (proteasas, lipasas y quitinasas), las cuales degradan el tejido facilitando la entrada del hongo (Schrank y Henning, 2010, Ojeda-Chi *et al.* 2011). Otro mecanismo que utilizan los hongos entomopatógenos para penetrar al hemocele es a través de la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas del hospedero. La forma en que los hongos entomopatógenos penetran al hemocele depende de las propiedades del grosor de la cutícula, y la presencia de sustancias anti

fúngicas o nutricionales del hospedero. Después de llegar al hemocele, los hongos realizan una transición dimórfica de micelio a blastospora para evadir el sistema inmune de los hospederos (Téllez-Jurado *et al.*, 2009, Schrank y Henning, 2010,); una vez evadido, se produce una septicemia que induce efectos fisiológicos anormales en el insecto como incoordinación, convulsiones y parálisis que generalmente resulta en la muerte del insecto. Por último, cuando las condiciones de humedad y temperatura son las adecuadas, las hifas del hongo emergen al exterior del cadáver donde esporulan y pueden dispersarse nuevamente. La dispersión de las esporas se realiza por acción del viento, la lluvia e incluso individuos enfermos al entrar en contacto con otros sanos (Shah y Pell, 2003).

Se ha reportado el mecanismo general por el cual los hongos entomopatógenos infectan a los artrópodos, pero no con el mismo nivel de detalle con el que se ha hecho en insectos (Fernandes *et al.*, 2012). El mecanismo por el cual los hongos entomopatógenos producen infección en las garrapatas debe de ser un tema mayormente estudiado por dos importantes razones: caracterizar los factores de virulencia que poseen los hongos entomopatógenos como agentes de biocontrol y especificar los mecanismos de defensa implementados por sus hospederos (Schrank y Henning, 2010). Este conocimiento puede ayudar en el aislamiento, selección y mejor utilización de los hongos entomopatógenos como método de control de garrapatas.

3.4.2 Antecedentes del uso de *Metarhizium anisopliae* para el control de la garrapata

El uso de *M. anisopliae* para el control de la garrapata *R. microplus* se ha evaluado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Diversos estudios *in vitro* han evaluado el efecto de *M. anisopliae* como agente de biocontrol sobre la oviposición, la eclosión, el potencial reproductivo y la mortalidad de los diferentes estadios de la garrapata *R. microplus* (huevos, larvas, ninfas y adultas). Existen varios reportes donde algunas cepas de *M. anisopliae* han logrado excelentes porcentajes de mortalidad bajo condiciones de laboratorio (mayores al 90%) (Ojeda-Chi *et al.*, 2010, Ruvalcaba *et al.*, 2010; Brogliio-Micheletti *et al.*, 2012). Se menciona que la variación en la virulencia que presentan los hongos entomopatógenos en estudios *in vitro* puede estar vinculada a factores intrínsecos de la cepa: como la diferencia en la cantidad de enzimas y toxinas (quitinolíticas) secretadas por cada cepa durante el proceso de infección, la edad de la cepa y la concentración de hongo utilizada (Schrank y Henning, 2010, Fernandes *et al.*, 2012). Con relación a los factores extrínsecos que pueden afectar negativamente el proceso de infección, se puede mencionar el estado fisiológico y etapa de desarrollo del hospedero (huevo, larva, ninfa, adulta). Se ha comprobado que existen cepas que tienen mayor eficacia sobre garrapatas adultas o ninfas (Ojeda-Chi *et al.*, 2010) y que otras tienen mayor efecto sobre la oviposición o la eclosión de huevos (potencial reproductivo) (Ruvalcaba *et al.* 2010). Las condiciones en las que crece *M. anisopliae* en laboratorio también pueden repercutir sobre su virulencia. Los principales factores que pueden llegar a afectarla son cultivarlas en un medio inadecuado (pH, temperatura), realizar pases sucesivos en medios

de cultivo artificiales, así como utilizar métodos de almacenamiento inapropiados (Fernandes *et al.*, 2012).

Por otro lado, se sabe que la virulencia del hongo incrementa o se restaura a su nivel original después de desarrollar un ciclo de vida sobre un hospedero (Fernandes *et al.*, 2012). En un estudio *in vitro* realizado por Campanharo *et al.* (2006) observaron que la asociación de ixodicidas químicos y *M. anisopliae* mostró mayores tasas de mortalidad en larvas que los obtenidos con las mismas concentraciones sin la asociación. Este tipo de mezclas pueden ser utilizadas para realizar un control integrado de garrapatas, no obstante, se debe de evaluar primero su eficacia en condiciones de campo.

Con relación a la evaluación del efecto acaricida de *M. anisopliae in vivo*, se han utilizado dos estrategias de uso: 1) la aplicación directa del hongo sobre los animales infestados, en la cual se busca controlar las fases parasitarias y/o de vida libre de la garrapata, y 2) la aspersión del hongo en los potreros con la finalidad de reducir el número de garrapatas en fase de vida libre (López *et al.*, 2009; Ojeda-Chi *et al.*, 2011). En general, se ha observado que cuando una cepa de *M. anisopliae* se evalúa en campo, la eficacia en el control de la garrapata es menor a la que mostró en estudios *in vitro* (Alonso-Díaz *et al.*, 2007). Esta disminución de la eficacia se atribuye a la participación de factores abióticos como la radicación, la temperatura y la humedad, que bajo condiciones de laboratorio son más controlados. Otro factor que también puede influir es el lugar de origen de las cepas (Braga *et al.*, 2001a). Existen cepas que presentan mayor tolerancia a altas temperaturas o a la exposición a la radiación UV (Braga *et al.*, 2001a, Ojeda-Chi *et al.*, 2011); esta variación en la tolerancia a los factores abióticos se ha vinculado con el lugar de procedencia de las cepas (Braga *et al.*, 2001a). Se ha reportado que las cepas aisladas de suelos agrícolas presentan mayor tolerancia a la luz UV en comparación de las cepas aisladas de suelos

forestales (Ojeda-Chi *et al.*, 2011). Por lo anterior, es importante que cuando se seleccionen cepas de *M. anisopliae* con potencial acaricida para el control de garrapatas, también se evalúe su tolerancia a los factores abióticos. Con este conocimiento posteriormente se puede seleccionar la mejor estrategia de su uso en campo.

3.5 Factores abióticos que limitan el efecto acaricida de *M. anisopliae* en campo.

Uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la utilización de *M. anisopliae* como control biológico, es el rápido decremento de su actividad patogénica al ser evaluada en campo. Se ha observado que su eficacia depende de las condiciones ambientales del lugar en el que se utiliza, donde factores tales como la nubosidad, la sombra, la temperatura ambiental y la variación de irradiación de acuerdo a la época del año, pueden afectar o contribuir a la persistencia de conidias en campo (Braga *et al.*, 2001b y d). Se ha reportado que las altas temperaturas, la variación del porcentaje de humedad (deseccación) y la radiación solar son los principales factores ambientales que reducen su viabilidad como bioinsecticida (Braga *et al.*, 2001d; Zimmermann, 1982). En un estudio realizado por Braga *et al.* (2001b), se observó que la exposición de conidias de *M. anisopliae* a la porción visible del espectro de luz solar no afectó la germinación ni el crecimiento de sus colonias. Pero, cuando estas conidias se expusieron a la porción de luz UV (UV-A y UV-B) se observó un marcado decremento de la germinación y el crecimiento de las colonias, con pocas horas de exposición (Braga *et al.*, 2001b).

La radiación ultravioleta o luz UV es parte del espectro de ondas electromagnéticas emitidas por el sol, que abarca longitudes de onda más cortas que la luz visible.

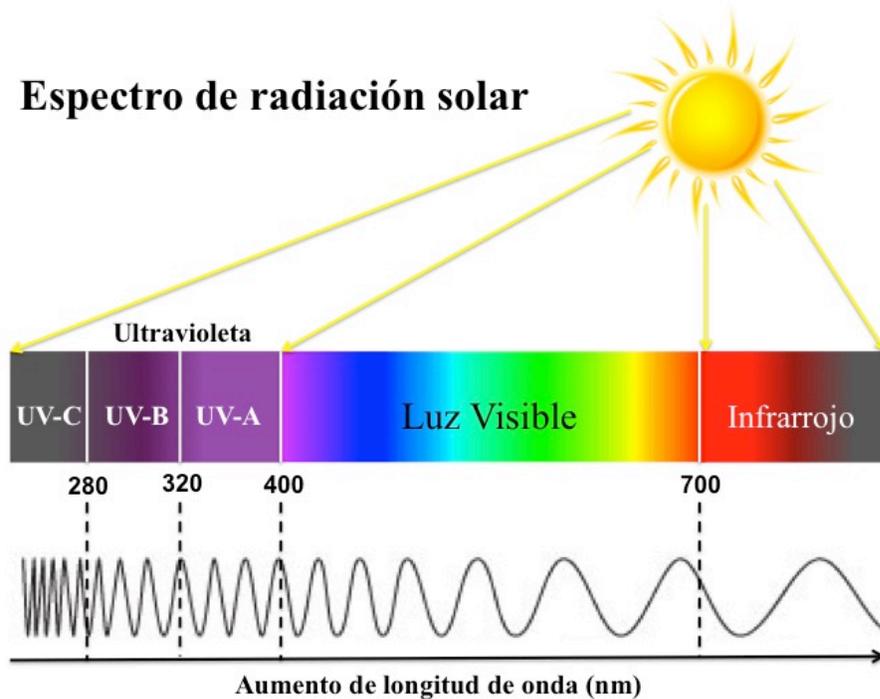


Figura 3. Espectro de irradiación emitido por la Luz solar. Lozano L. 2015

La porción del espectro UV se subdivide en tres zonas: 1) la zona UV-A (320-400 nm), que es la porción menos energética de la radiación UV y la más cercana a la región visible del espectro, 2) la zona UV-B (280-320 nm) y, 3) la zona UV-C (longitudes de onda < 280 nm) que es la porción más energética del espectro, de tal forma que posee una importante acción bactericida (Figura 3). La mayor parte de la radiación UV-C sufre una fuerte dispersión al atravesar la atmósfera debido a que se absorbe a su paso por la capa de ozono, por lo que prácticamente no está presente sobre la tierra. A mayor latitud, es menor la incidencia de radiación UV debido a una mayor inclinación de los rayos solares, lo que implica un mayor recorrido de la radiación a través de la atmósfera y, por lo tanto, una mayor absorción. Un

efecto parecido tiene la altitud, las regiones que están a mayor altura sobre el nivel de mar reciben una mayor intensidad de radiación UV-B en comparación a las zonas mas bajas.

El principal efecto biológico producido por la exposición de microorganismos a la luz UV son alteraciones fotoquímicas, ya que este tipo de radiación electromagnética no ionizante produce efectos fisiológicos por mecanismos no térmicos, sino fotobiológicos. Estos efectos se producen por la absorción selectiva de longitudes de onda por parte de ciertas moléculas biológicas, de modo que se producen moléculas alteradas denominadas genéricamente fotoproductos (Harm, 1980). El ADN es altamente susceptible a la radiación UV, los fotoproductos generados por la radiación UV en el ADN derivan principalmente de alteraciones en las bases pirimidínicas (citosina y timina) con la formación predominante de dímeros de pirimidina (Harm, 1980). Los dímeros de pirimidina son uniones aberrantes entre dos pirimidinas adyacentes en la misma hebra de ADN, de forma que, se provoca una interferencia en los procesos de replicación y transcripción ya que se interfiere con el emparejamiento normal de bases complementarias entre las dos hebras de ADN. Estas alteraciones pueden verse reflejadas en una variedad de consecuencias biológicas, como la letalidad, la inducción de mutaciones, el retraso del crecimiento o división celular, o el aumento de la recombinación genética (Harm, 1980).

El ADN es fundamental para la replicación de los organismos ya que en el se almacena toda la información genética del individuo, debido a esto, existen una serie de mecanismos evolutivos desarrollados con el fin de enfrentarse a los posibles daños ocasionados por la radiación ultravioleta. Los principales mecanismos evolutivos son: Mecanismos pre-replicativos y mecanismos pos-replicativos. La exposición a la radiación ultravioleta

también puede afectar estructuras citoplasmáticas y de membrana. (Schwarz, 1988; Zarzosa,1980).

La exposición de conidias de *M. anisopliae* a la radiación UV-A y UV-B afecta considerablemente su eficacia como bioinsecticida, esto puede estar relacionado al efecto adverso que causa la radiación sobre su material genético (Braga *et al.*, 2006). Para contrarrestar esto, se han realizado distintos esfuerzos, como la adición de fotoprotectores a las formulaciones de hongos (Fernandes *et al.*, 2012; Leemon y Jonsson 2008), la aplicación nocturna de los tratamientos (Alonso-Díaz *et al.*, 2007), así como la selección de cepas con mayor tolerancia a la luz UV (Braga *et al.*, 2001a). El éxito de la eficacia de *M. anisopliae* como agentes de biocontrol contra garrapatas probablemente se basa, al menos parcialmente, en los avances en el desarrollo de formulaciones que incrementen la persistencia de las conidias en campo (Fernandes *et al.*, 2012). Por lo anterior, se han realizado evaluaciones de conidias de *M. anisopliae* con diferentes formulaciones para determinar el grado de tolerancia que presenta a la luz UV (Alves *et al.*,1998). Diversos estudios han demostrado que las formulaciones hechas a base de aceite mejoran la tolerancia a la radiación UV de algunas cepas en comparación con las formulaciones convencionales hechas a base de agua. Las formulaciones de hongos tienen un importante papel en la optimización de la actividad de un micoinsecticida ya que el objetivo fundamental de crear una formulación fúngica es contribuir a la viabilidad, estabilidad, virulencia y eficacia del agente mediante su protección (Alves *et al.*,1998). Braga *et al.* (2001d) encontraron que al remojar ligeramente las conidias de *M. anisopliae* antes de los tratamientos de irradiación UV, se fomentó que la conidias se sincronizaran y germinaran de manera más rápida, tanto en el medio de cultivo como sobre la cutícula del hospedero.

Lo anterior resultó en un aumento a la tolerancia a la radiación UV-B debido al incremento de la actividad metabólica de las conidias. Es necesario seguir realizando estudios para aislar, evaluar, seleccionar y realizar formulaciones de cepas de *M. anisopliae*, que además de presentar alta virulencia contra garrapatas, posean alta tolerancia a condiciones ambientales del lugar donde se utilizarán, como el calor y la radiación UV. La generación de este conocimiento permitirá elegir una mejor estrategia de uso en campo para cada cepa.

4. HIPÓTESIS

Las cepas de *M. anisopliae* con potencial acaricida endémicas de suelos de unidades de producción bovina, presentarán diferentes grados de tolerancia/susceptibilidad a la radiación UV.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la exposición a la radiación ultravioleta sobre las cepas de *M. anisopliae*, exponiendo sus conidias directamente a una fuente de luz UV para determinar el grado de tolerancia/susceptibilidad que presentan.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la exposición a la radiación ultravioleta sobre la germinación de conidias de hongos entomopatógenos.
- Evaluar el efecto de la exposición a la radiación ultravioleta sobre el crecimiento de colonias de hongos entomopatógenos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Sanidad Animal del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se localiza en el Km 5.5 de la Carretera Federal Tlapacoyan-Martínez de la Torre, en el Municipio de Tlapacoyan, Veracruz. Está situado a 20° 2' 6.1224'' latitud norte, 97° 6' 9.6912'' longitud oeste, a una altitud de 110.9 msnm. El clima de esta zona es cálido húmedo Af (m) W'' (e) con una temperatura media anual de 24.4 °C, 85% de humedad relativa y precipitación pluvial de 1990 mm (García, 1981).

6.2 Obtención de conidias

Se utilizaron cepas de *M. anisopliae* aisladas durante el 2013, de suelos de unidades de producción bovina que presentaban elevada prevalencia de garrapatas *R. microplus* y *A. cajannense*, ubicadas en la zona centro-norte del estado de Veracruz.

Actualmente estas cepas se encuentran en el Laboratorio de Sanidad Animal del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT). De las 59 cepas aisladas de *M. anisopliae*, se seleccionaron ocho que mostraron mayor grado de virulencia *in vitro* contra diferentes estadios de *R. microplus* (MaV02, MaV05, MaV08, MaV13, MaV25, MaV31, MaV35, MaV55) (Fernández-Salas, 2013).

6.3 Producción de conidias y preparación del inóculo

El crecimiento y la reproducción de los hongos seleccionados se realizó en cajas de Petri con 20 ml de Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) adicionado con 1% de extracto de levadura y 500 ppm de cloranfenicol (Cañedo y Ames, 2004). Cada cepa se incubó a 27 ° C y 90% de humedad relativa durante 15 días en una estufa de cultivos, posteriormente las conidias fueron cosechadas por raspado y lavado de la superficie del medio de cultivo con 20 ml de agua destilada estéril que fue vertida en tubos Falcon® de 50 ml. La suspensión se homogeneizó con ayuda de un agitador vórtex (Thermo Scientific®, modelo No: M37615) y fue filtrada a través de una membrana de nitrato de celulosa (25 mm de diámetro, poros de 8 µm; Sartorius®) con el objetivo de obtener una suspensión de conidias solas, sin el uso de surfactantes (Braga *et al.*, 2001c).

Para determinar la concentración de conidias, se utilizó una cámara de NeuBauer o hemocitómetro. Las diluciones fueron realizadas con agua destilada estéril y refrigeradas a 4° C durante 24 h, antes de la exposición a los tratamientos de radiación UV.

6.4 Tratamientos de irradiación, lámparas y filtros

El tratamiento de irradiación con rayos UV (UV-A y UV-B) a las diferentes cepas de *M. anisopliae* se realizó exponiendo las conidias a una lámpara de emisión de radiación UV de una campana de flujo laminar (Biosafe® Modelo: BBS-H1300).

El espectro de radiación de la lámpara UV se determinó mediante un espectrofotómetro (Ocean Optics® Spectrometer número de serie HR4B183), antes del inicio del experimento. Para evaluar el efecto de las ondas UV (A o A+B) sobre el tratamiento de conidias, se utilizaron los siguientes filtros:

1) Filtro de vidrio (Thorlabs® Modelo: FGUV11s). Este filtro permitió un paso de banda de 280 nm – 370 nm, lo cual aseguró el paso de una longitud de onda UV-B (280-320nm) y una fracción de UV-A (320-400nm). No permitió el paso de los rayos UV-C, ni la luz visible.

2) Filtro de vidrio (Thorlabs® Modelo: FGB18). Este filtro no permitió el paso de banda de longitudes de onda menores a 400 nm (luz UV).

3) Filtro de vidrio (Thorlabs® Modelo: FGB75). Este filtro obstaculizó el paso de rayos UV-B y UV-C permitiendo el paso de UV-A y una porción del espectro de luz visible.

Durante el proceso de irradiación, se monitoreó la humedad y temperatura dentro de la campana de flujo laminar.

El material biológico irradiado se cubrió con los filtros mencionados. Con ayuda de estos filtros, se logró monitorear el efecto del tratamiento con irradiación UV-A y UV-A+B sobre las variables a evaluar.

6.5 Diseño experimental y mediciones

Efecto de la radiación UV sobre el porcentaje de germinación de conidias de *M. anisopliae*.

Para cada una de las cepas de *M. anisopliae* se sembraron 200 μL de conidias a una concentración de 1.5×10^5 conidias/ml en un medio de cultivo papa dextrosa agar enriquecido con extracto de levadura (PDAY) contenido en cajas de Petri con tres divisiones (3 ml por división) 100x15 mm de plástico estéril desechable. Inmediatamente después, se expusieron a los diferentes tratamiento de radiación UV durante 3h. Se utilizó un grupo control negativo (protegidas con un filtro que no permitió el paso de las ondas menores a 400 nm) y un grupo control positivo (que permitió el paso de todo el espectro de onda). Se utilizaron tres réplicas por cada tratamiento. Después del tratamiento, los cultivos se incubaron a 28° C y 90% de humedad relativa, en completa oscuridad. Se evaluó la germinación de las conidias mediante observación en un microscopio compuesto con un objetivo 40x, 12 h después de haber sido sembradas en el medio. Se consideró germinada una conidia cuando el largo de su tubo germinal era mayor al diámetro de la propia conidia (Braga *et al.*, 2001c). Se evaluaron un total de 300 conidias por tratamiento.

Efecto de la radiación UV sobre el crecimiento de colonias de conidias de *M. anisopliae*.

Para evaluar el crecimiento de colonias de *M. anisopliae* bajo el efecto de radiación UV se utilizaron 200 µl de dilución a una concentración de 1.5×10^3 conidias/ ml en medio de cultivo PDAY. Se sometieron a los mismos tratamientos de irradiación. Después de los tratamientos, los cultivos fueron incubados a 28°C y 90% de humedad relativa, en completa oscuridad (Braga *et al.*, 2001d).

El porcentaje relativo del crecimiento de colonias se evaluó comparando las unidades formadoras de colonias de los ensayos irradiados contra los controles del mismo tratamiento (Braga *et al.*, 2001d).

6.6 Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva (media y desviación estándar) para los diferentes tratamientos. Para evaluar el efecto de la radiación UV sobre la germinación de conidias de *M. anisopliae*, se utilizó la prueba de ANOVA. Para evaluar el efecto de los tratamientos con luz UV sobre el crecimiento de colonias de *M. anisopliae* se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. En ambas pruebas se utilizó un valor de $P < 0.05$ para determinar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Statgraphics Centurion. Versión 17.1.02 64bit).

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de la radiación UV sobre el porcentaje de germinación de conidias de *M. anisopliae*.

El efecto de la exposición a la radiación UV- A (nm) sobre el porcentaje de germinación de conidias de ocho cepas de *M. anisopliae* se muestra en el Cuadro 1. La exposición a la radiación UV-A de las cepas 25MaV, 13MaV, 08MaV, 05MaV y 31MaV no afectó el porcentaje de germinación en comparación al grupo control ($P > 0.05$). Lo anterior indica que estas cepas presentaron mayor tolerancia a la exposición a la radiación UV-A. Las cepas 25MaV, 08MaV y 31MaV mostraron el menor porcentaje de reducción de germinación de esporas, que indica una mayor capacidad de tolerar la luz UV-A sobre el porcentaje de germinación. Las cepas 55MaV, 35MaV y 02MaV mostraron mayor susceptibilidad a la radiación UV-A sobre el porcentaje de germinación de sus conidias ($P < 0.05$).

Cuadro 1. Tolerancia de ocho cepas de *Metarhizium anisopliae* al efecto de la radiación UV-A sobre el porcentaje (%) de germinación de conidias.

Cepa	% Germ Gpo Cx	% Germ Tx UV-A	% Red UV-A
25 Ma V	71.33 ± 6.5 ^a	64.33 ± 3.5 ^a	10
55 Ma V	62.00 ± 3.0 ^a	44.33 ± 2.9 ^b	28
35 Ma V	77.00 ± 4.3 ^a	61.33 ± 3.5 ^b	20
13 Ma V	51.67 ± 2.1 ^a	44.33 ± 7.6 ^a	14
08 Ma V	73.33 ± 8.1 ^a	67.33 ± 6.6 ^a	08
05 Ma V	71.33 ± 17.2 ^a	64.00 ± 2.6 ^a	10
31 Ma V	91.33 ± 1.5 ^a	86.00 ± 3.6 ^a	06
02 Ma V	24.00 ± 2.6 ^a	08.33 ± 0.6 ^b	65

Distinta literal entre columnas indica diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($P < 0.05$)

El Cuadro 2, muestra el efecto de la exposición a la radiación UV- A+B (nm) sobre el porcentaje de germinación de conidias de las ocho cepas de *M. anisopliae*. La radiación UV- A+B disminuyó el porcentaje de germinación de todas las cepas de *M. anisopliae* evaluadas ($P < 0.05$); además, el porcentaje de reducción fue mayor al 95% para todas las cepas. Lo anterior indica que las cepas mostraron alta susceptibilidad a la exposición a radiación UV- A+B.

Cuadro 2. Tolerancia de ocho cepas de *Metarhizium anisopliae* al efecto de la radiación UV-A + UV-B sobre el porcentaje (%) de germinación.

Cepa	% Germ Gpo Cx	% Germ Tx UV-A+B	% Red UV-A
25 Ma V	71.33 ± 6.5 ^a	3.00 ± 4.3 ^b	96
55 Ma V	62.00 ± 3.0 ^a	0.33 ± 0.6 ^b	99
35 Ma V	77.00 ± 4.3 ^a	3.33 ± 2.1 ^b	96
13 Ma V	51.67 ± 2.1 ^a	0.67 ± 1.1 ^b	99
08 Ma V	73.33 ± 8.1 ^a	0.67 ± 1.1 ^b	99
05 Ma V	71.33 ± 17.2 ^a	1.00 ± 0.0 ^b	98
31 Ma V	91.33 ± 1.5 ^a	1.33 ± 1.5 ^b	98
02 Ma V	24.00 ± 2.6 ^a	0.00 ± 0.0 ^b	100

Distinta literal entre columnas indica diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($P < 0.05$).

7.2 Efecto de la radiación UV sobre el crecimiento de colonias de *M. anisopliae*.

El efecto de la exposición a la radiación UV- A (nm) sobre el crecimiento de colonias de las ocho cepas de *M. anisopliae* se muestra en el Cuadro 3. Las ocho cepas evaluadas mostraron buena tolerancia a la exposición a la radiación UV-A (25MaV, 55MaV, 35MaV, 13MaV, 08MaV, 05MaV, 31MaV y 02MaV), medido mediante el porcentaje de reducción del crecimiento de colonias o mediante las diferencias estadísticas del crecimiento de colonias del grupo tratado en comparación al grupo control ($P > 0.05$).

Cuadro 3. Tolerancia de ocho cepas de *Metarhizium anisopliae* al efecto de la radiación UV-A sobre el crecimiento de colonias (UFC).

Cepa	# Total UFC Gpo Cx	# Total UFC Tx UV-A	% Red UV-A
25 Ma V	275 ^a	254 ^a	08
55 Ma V	167 ^a	158 ^a	05
35 Ma V	233 ^a	180 ^a	23
13 Ma V	230 ^a	226 ^a	02
08 Ma V	431 ^a	368 ^a	15
05 Ma V	421 ^a	460 ^b	00
31 Ma V	323 ^a	318 ^a	02
02 Ma V	361 ^a	399 ^a	00

Distinta literal entre columnas indica diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($P < 0.05$)

El Cuadro 4, muestra el efecto de la exposición a la radiación UV- A+B (nm) sobre el crecimiento de colonias de las ocho cepas de *M. anisopliae*. La radiación UV- A+B no afectó significativamente el crecimiento de colonias de seis de las cepas de *M. anisopliae* evaluadas (35MaV, 13MaV, 08MaV, 05MaV, 31MaV y 02MaV) en comparación al grupo control ($P > 0.05$). Lo anterior indica que estas cepas presentaron mayor tolerancia a la exposición a la radiación UV-A+B sobre el crecimiento de sus colonias. Las cepas 25MaV y 55MaV mostraron menor tolerancia a la exposición a radiación UV-A+B ($P < 0.05$).

Cuadro 4. Tolerancia de ocho cepas de *Metarhizium anisopliae* al efecto de la radiación UV-A + UV-B sobre el crecimiento de colonias (UFC).

Cepa	# Total UFC Gpo Cx	# Total UFC Tx UV-A+B	% Red UV-A+B
25 Ma V	275 ^a	68 ^b	75
55 Ma V	167 ^a	2 ^b	99
35 Ma V	233 ^a	63 ^a	73
13 Ma V	230 ^a	19 ^a	92
08 Ma V	431 ^a	95 ^a	78
05 Ma V	421 ^a	48 ^a	89
31 Ma V	323 ^a	29 ^a	91
02 Ma V	361 ^a	17 ^a	95

Distinta literal entre columnas indica diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($P < 0.05$)

8. DISCUSIÓN

Se ha reportado que la irradiación con rayos UV a las conidias de *M. anisopliae* puede causarles daños severos que pueden afectar su sobrevivencia o retrasar su germinación (Braga *et al.*, 200d), la adhesión y la germinación del hongo sobre la cutícula del hospedero son eventos determinantes para que ocurra la infección de sus hospederos (Rangel *et al.*, 2004; Beys Da Silva *et al.*, 2010). En este estudio, cinco de las ocho cepas de *M. anisopliae* evaluadas, mostraron mayor tolerancia a la radiación UV-A medido mediante el porcentaje de germinación de conidias. Braga *et al.* (2001a), al evaluar la tolerancia a la radiación UV-B de diversas cepas de *M. anisopliae* aisladas de diferentes latitudes, reportaron una alta variabilidad en la susceptibilidad a los rayos UV entre cepas.

La variación en la tolerancia/susceptibilidad de *M. anisopliae* a la radiación UV-A o UV-B se puede atribuir a diversos factores. Existe una alta variabilidad genética entre cepas de *M. anisopliae* lo cual se puede expresar como diferentes grados de tolerancia a la radiación UV. Por ejemplo, se ha correlacionado positivamente el grado de pigmentación de las cepas de *M. anisopliae* con la tolerancia a la radiación UV. Braga *et al.* (2006) mencionan que la pigmentación de las colonias puede deberse a una expresión genética adquirida durante el proceso evolutivo o de selección de las cepas y es indicativo de una adaptación al medio ambiente. Otro factor al que se puede atribuir la variabilidad que existe en la tolerancia a la radiación UV, es el origen geográfico de las cepas. *Metharizium anisopliae* se ha aislado en una amplia zona geográfica que va desde latitudes mayores a los 60° N hasta latitudes cercanas a los 55° S (Schrank y Henning 2010, Braga *et al.*, 2001a); lo anterior implica, que las diversas cepas de *M. anisopliae* estén expuestas a una amplia diversidad de factores medioambientales, diferentes especies hospederas, temperaturas, rangos de humedad y

diferentes niveles de irradiación. La irradiancia disminuye a mayor latitud y a menor altitud (Braga *et al.*, 2001a). Si los niveles de irradiancia actúan como un importante factor de selección de las poblaciones de *M. anisopliae*, es de suponer que las cepas de lugares sujetos a niveles más altos de radiación presentarán mayor tolerancia y viceversa. En este estudio, se seleccionaron cepas de *M. anisopliae* que fueron aisladas de suelos de unidades de producción bovina en el trópico de Veracruz, México. Es posible que algunos de los factores que se mencionan puedan contribuir en el grado de tolerancia/susceptibilidad que presentaron a la radiación UV las cepas evaluadas. No obstante, es necesario seguir evaluando algunas características de estas cepas como la clasificación taxonómica mediante pruebas moleculares, el grado de pigmentación y su comportamiento en campo.

En este estudio, cuando se evaluó el efecto de la radiación UV-A+B sobre el porcentaje de germinación de conidias, se observó que la radiación retrasó la germinación de las conidias de las ocho cepas de *M. anisopliae* evaluadas. Diversos estudios han reportado que la exposición a radiación UV-B retrasa la germinación de las conidas sobrevivientes de *M. anisopliae* (Alves *et al.*, 1998). También, se ha reportado que el retraso en la germinación de conidias es directamente proporcional a la dosis de irradiación a la que fueron expuestas (Braga *et al.*, 2001d). Braga *et al.* (2001c) encontraron que el incremento en la radiación UV afecta de diferente manera las distintas etapas del ciclo celular de los hongos entomopatógenos. Para *M. anisopliae* la etapa más sensible a la radiación UV fue la fase final de la germinación, durante o después de la aparición del tubo germinal (Braga *et al.*, 2001d). En varias especies de hongos filamentosos se ha demostrado que la duplicación de su ADN ocurre durante la fase final de la germinación, tiempo en que la irradiación puede causar mayor daño. También observaron que entre mayor era la dosis a la que fueron expuestas mayor era el decremento de la germinación que causaba (Braga *et al.*, 2001c).

Es necesario resaltar que en este trabajo, la exposición de las cepas de *M. anisopliae* a la radiación UV se realizó *in vitro*, mediante la utilización de lámparas de irradiación a dosis específicas. Si bien este estudio permitió identificar cepas de *M. anisopliae* más tolerantes a la radiación UV, es necesario realizar estudios *in vivo* para evaluar su comportamiento en campo, ya que la supervivencia de las diferentes cepas de *M. anisopliae* puede variar considerablemente en función de los cambios en la radiación solar a través del día y la época del año, además de la interacción de otras variables climatológicas como la humedad y la temperatura.

En este trabajo, no hubo efecto negativo de la radiación UV-A sobre el crecimiento de colonias de las ocho cepas de *M. anisopliae* evaluadas. Existen escasos estudios sobre la evaluación de la radiación con UV-A sobre el crecimiento de colonias de hongos entomopatógenos. Esto a pesar de que algunos autores han sugerido evaluar el efecto de esta fracción del espectro UV debido a que se ha demostrado claramente el efecto negativo que causa sobre la sobrevivencia y germinación de *M. anisopliae* bajo condiciones de campo (Braga *et al.*, 2001b); además, la radiación UV-A comprende el 95% del espectro solar que llega a la tierra en el rango de UV. Es importante mencionar, que este trabajo se realizó bajo condiciones *in vitro* mediante el uso de lámparas de emisión de radiación UV. Se ha reportado que la radiación UV-A emitida por lámparas difícilmente pueden presentar una distribución espectral similar a la emitida por el sol; normalmente, las lámparas presentan valores de irradiancia significativamente más bajos en la fracción de UV-A (Braga *et al.*, 2001b). Sin embargo, con la dosis espectral emitida se pudo observar una diferencia en la sensibilidad de las diferentes cepas de *M. anisopliae* a la radiación UV-A entre la germinación de conidias y el crecimiento de colonias.

En este estudio, se observó que la exposición a la radiación UV-A+B afectó el crecimiento de colonias de las cepas 25MaV y 55MaV evaluadas. Estos resultados son consistentes con los reportado por Braga *et al.* (2001d), quienes reportaron un retraso en la germinación de conidias, lo cual se ve reflejado en el crecimiento de colonias. El retraso de la germinación de conidias está asociado a la necesidad celular de reparar el daño causado por la irradiación antes de poder continuar con el ciclo celular; de esta forma, la célula previene la duplicación de ADN dañado que puede incrementar la susceptibilidad de su descendencia, además de mantener la integridad del material genético (Alves *et al.*, 1998; Braga *et al.*, 2001d; Rangel *et al.*, 2005). Esta interrupción temporal de la germinación puede perjudicar la eficacia del hongo como bioinsecticida ya que parte de la virulencia de *M. anisopliae* se asocia a la velocidad de su germinación. Las cepas que germinan rápido y penetran la cutícula del hospedero, tienen mayor oportunidad de producir una infección exitosa (Braga *et al.*, 2001d). En otro estudio realizado por Rangel *et al.* (2004) encontraron que la tolerancia a la radiación UV y la velocidad de germinación de las conidias de *M. anisopliae* puede variar en función del sustrato o medio de cultivo (ambiente nutricional) en el que crecen. La cantidad de reservas nutricionales que posee cada conidia aparentemente depende del medio en el que son producidas, estas reservas endógenas determinan el tiempo que le toma a la conidia empezar a germinar, además, el medio de cultivo en el que se desarrollan también puede afectar la morfología de la colonia y su pigmentación (Rangel *et al.*, 2005). La manipulación de estas variables puede utilizarse para la obtención de conidias con mayor tolerancia a la radiación UV y la disminución del tiempo de germinación.

9. CONCLUSIÓN

Las cepas de *M. anisopliae* 08MaV, 31MaV, 05MaV, 13MaV aisladas de suelos de unidades de producción bovina del trópico mexicano, mostraron buena tolerancia a la exposición a radiación UV (A o A+B) sobre la germinación de sus conidias y/o crecimiento de colonias. Debido a que estas cepas, además de su tolerancia a la radiación UV, también poseen buena patogenicidad contra diferentes estadios de *R. microplus*, se sugiere seguir realizando estudios tanto *in vitro* como *in vivo* para evaluar otros factores o características relacionadas con la variación de la efectividad de *M. anisopliae* como alternativa de control de plagas.

10. REFERENCIAS

Alonso-Díaz, M.A.; Rodríguez-Vivas, R.I.; Fragoso-Sanchez, H. y Rosario-Cruz, R. (2006). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. Arch Med Vet, 38, N° 2.

Alonso-Díaz, M.A.; Garcia, L.; Galindo, V.E.; Lezama, G.R.; Angel, S.C.A.; Rodríguez, V.R.I. y Fragoso, S.H. (2007). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. Vet Parasitol, 147, 336-340.

Álvarez, V.; Loaiza, J.; Bonilla, R.; y Barrios, M. (2008). Control *in vitro* de garrapatas (*Boophilus microplus*; Acari: Ixodidae) mediante extractos vegetales. Rev Biol Trop, 56(1): 291-302

Alves, R.T.; Batema, R.P.; Prior, C. y Leather, S.R. (1998). Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metharizium anisopliae* in different formulations. Crop Prot, 17(8): 675-679.

Beys Da Silva, W.O.; Santi, L.; Schrank, A.; y Vainstein, M.H. (2010). *Metharizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. Fungal Biol, 114:10-15.

Braga, G.U.L.; Flint, S.D.; Miller, C.D.; Anderson, A.J. y Roberts, D.W. (2001a). Variability in Response to UV-B among Species and Strains of *Metarhizium* Isolated from sites at Latitudes from 61°N to 54°S. *J Invertebr Pathol*, 78, 98-108.

Braga, G.U.L.; Flint, S.D.; Miller, C.D.; Anderson, A.J. y Roberts, D.W. (2001b). Both Solar UVA and UVB Radiation Impair Conidial Culturability and Delay Germination in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photoch Photobiol*, 74(5):734-739.

Braga, G.U.L.; Flint, S.D.; Messias, C.L.; Anderson, A.J. y Roberts, D.W. (2001c). Effects of UVB Irradiance on Conidia and Germinants of the Entomopathogenic Hypomycete *Metarhizium anisopliae*: A Study of Reciprocity and Recovery. *Photoch Photobiol*, 73(2): 140-146.

Braga, G.U.L.; Flint, S.D.; Messias, C.L. y Anderson A.J. Roberts D.W. (2001d). Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res*, 105(7): 874-882.

Braga, G.U.L.; Rangel, D.E.N.; Flint, S.D.; Anderson A.J. y Roberts D.W. (2006). Conidial Pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metharizium anisopliae*. *Photoch Photobiol*, 82: 418-422.

Broglio-Micheletti, S.M.F; de Souza, L.A.; Valente, E.C.N.; de Araújo, M.J.C.; da Silva, N.D. y Gómez-Torres, M.L. (2012) Evaluation of entomopathogenic fungi as biological

control agents *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). IDESIA (Chile), 30:93-99

Cañedo, V. y Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa(CIP).

Campanharo, T.B.; Kamp, E.K.F. y Pinheiro, V.R.E. (2006) Compatibility of the fungus *Metharizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. Vet Parasitol, 141: 319-324.

Fernandes, É.K.K.; Bittencourt, V.R.E.P. y Roberts, W.D. (2012). Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. Exp Parasitol, 130: 300-305.

Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero. Panorama de la carne y leche de bovino. SHCP (2014), [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Bovino%20\(may%202014\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Bovino%20(may%202014).pdf).

Financiera Rural. Monografía de carne de bovino. Dirección general adjunta de planeación estratégica y análisis sectorial (2012), [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaCarneBovino\(feb2012\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaCarneBovino(feb2012).pdf).

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. FAO (2013), <http://www.fao.org/americas/perspectivas/ganaderia/es/>. Abril 2015.

Gallardo, F.L.; Chalate, H.M.; Purroy, R.V. y Vilaboa, J.A. (2010). Estudio y análisis del mercado de los productos del sistema bovinos doble propósito en el estado de Veracruz. Colegio de postgraduados, Fundación Produce Veracruz.

García, E. (1981) Modificaciones del sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). 2da Reimp. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF.

Goettel, M.S.; Eilenberg, J. y Glare, T. (2005). Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. en Gilbert, L.I.; Iatrou, K. y Gill, S.S. (eds), *Comprehensive Molecular Insect Science*, 6: 361-406.

Harm, W. (1980). The study of biological UV effects. En: *Biological effects of ultraviolet radiation*. Hutchinson, F.; Fuller, W.; y Mullins, L.J. (eds). Cambridge-London, New York-USA: Cambridge University Press, 2:8-22. IUPAB biophysics series;1. ISBN 0-521 29362-6.

Jonsson N.N. (2006) The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet Parasitol*, 137:1-10.

Leemon, D.M. y Jonsson, N.N. (2008). Laboratory Studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for cattle tick *Boophilus microplus*. *J Invertebr Pathol*, 97: 40-49.

López, E.; López, G. y Orduz S. (2009). Control de la garrapata *Boophilus microplus* con *Metarhizium anisopliae*, estudios de laboratorio y campo. *Rev Colomb Entomol*, 35(1): 42-46.

Nuñez, J.L.; Muñoz, C.M. y Moltedo, H.L. (1982). *Boophilus microplus* la garrapata común del ganado vacuno. Buenos aires, Argentina. Editorial Hemisferio Sur. 184.

Ojeda-Chi C.M.M.; Rodríguez-Vivas, R.I.; Galindo, V.E.; Lezama, G.R. y Cruz, V.C. (2011). Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Rev Mex Cienc Pecu*, 2(2): 177-192.

Ojeda-Chi, M.M.; Rodríguez-Vivas, R.I.; Galindo, V.E.; Lezama, G.R. (2010). Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*) for the control of *Rhipicephalus microplus* (*Acari: Ixodidae*) in the Mexican tropics. *Vet Parasitol*, 170: 348-354.

Rangel, D.E.N.; Braga, G.U.L.; Anderson, A.J. y Roberts D.W. (2004) Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. *J Invertebr Pathol*, 87:77-83.

Rangel, D.E.N.; Braga, G.U.L.; Flint, S.D.; Anderson, A.J. y Roberts D.W. (2005) Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. J Invertebr Pathol, 90: 55-58.

Rodríguez-Vivas, R.I.; Rosado-Aguilar, J.A.; Basto, E.G.; Garcia-Vazquez, Z.S.; Rosario-Cruz, R. y Fragoso, S.H. (2006). Manual técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino. Editores: INIFAP. Publicación técnica núm. 4. CENID PAVET. ISBN 970-43-0073-5

Rodríguez-Vivas, R.I.; Ojeda-Chi, M.M.; Prez-Cogollo, L.C. y Rosado-Aguilar, J.A. (2011). Epidemiología y control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en México. En: Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. Editores: Quiroz, H.R.; Figueroa, J.A.C.; Ibarra, F.V. y López, M.E.A. AMPAVE, 33:477-504. ISBN 978-607-00-4015-3.

Rodríguez-Vivas, R.I.; Hodgkinson, J.E. y Trees, A.J. (2012). Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia. Rev Mex Cienc Pecu, 3(Supl 1):9-24.

Rodríguez-Vivas, R.I.; Rosado-Aguilar J.A.; Ojeda-Chi, M.M.; Pérez-Cogollo, L.C.; Trinidad-Martinez, I. y Bolio-González, M.E. (2014). Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios, 1(3):295-308.

Ruvalcaba, M. F.; Padilla, A. M. B.; Vázquez, C. C. y Velázquez, V. M. H. (2010). Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la inhibición de oviposición, eclosión y potencial reproductivo en una cepa triple resistente de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini)(Acari: Ixodidae). *Entomotropica*, 25(3), 109-115.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Se consolida México como el séptimo productor de proteína animal en el mundo (DF): SAGARPA, 2014. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2014B1028.aspx>. Mayo 2015

Shah, P. A. y Pell, J. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *App Microbiol Biotechnol*, 61(5-6):413-423.

Schwarz T. (1998). UV light affects cell membrane and cytoplasmic target. *J Photoch Photobiol*, 44: 91-96.

Schrank, A. y Henning, M.V. (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56:1267-1274.

StatPoint Inc., 2007. Statgraphics Centurion 17.1.02 (64bit) Disponible desde: www.statgraphics.com

Télez-Jurado, A.; Cruz, M.G.R.; Mercado, F.Y.; Asaff, A.T. y Arana-Cuenca, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Rev Mex Micol*, 30:73-80.

Zarzosa, A.P. (1980) The effect of ultraviolet radiation on the growth of *Neurospora crassa* hyphae [tesis de maestría]. Degree in Biophysics and Bioengineering of the University of London.

Zimmermann, G. (1982) Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol*, 40:36-40.

Zimmerman, G. (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci Technol*, 17(9):879-920.